



HAL
open science

Apport du multi-traçage isotopique (^{26}Mg , ^{44}Ca et ^2H) à la connaissance des flux d'éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers

Gregory van Der Heijden

► **To cite this version:**

Gregory van Der Heijden. Apport du multi-traçage isotopique (^{26}Mg , ^{44}Ca et ^2H) à la connaissance des flux d'éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers. Sylviculture, foresterie. AgroParisTech, 2013. Français. NNT : 2013AGPT0013 . pastel-01058253

HAL Id: pastel-01058253

<https://pastel.hal.science/pastel-01058253>

Submitted on 26 Aug 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement**

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences Forestières

présentée et soutenue publiquement par

Gregory VAN DER HEIJDEN

le 4 février 2013

Apport du multi-traçage isotopique (^{26}Mg , ^{44}Ca et ^2H) à la connaissance des flux d'éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers

Directeur de thèse **Etienne DAMBRINE**
Co-encadrement de la thèse : **Arnaud LEGOUT**

Jury

M. Dale W. JOHNSON, Professeur, Nevada University

M. Jérôme BALESDENT, Directeur de recherche, UR GSE, INRA Aix-en-Provence

M. Christian FRANCE LANORD, Directeur de recherche, CNRS-CRPG, Nancy

M. Jean-Claude GEGOUT, Professeur, UMR LERFoB, AgroParisTech-ENGREF

M. Laurent AUGUSTO, Chargé de recherche, UMR TCEM, INRA-Bordeaux

M. Etienne DAMBRINE, Directeur de recherche, UMR CARTELE, INRA-Université de Savoie

M. Arnaud LEGOUT, Chargé de recherche, UR BEF, INRA-Nancy

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Examinateur

Directeur de thèse

Co-encadrant de thèse

Apport du multi-traçage isotopique (^{26}Mg , ^{44}Ca et ^2H) à la connaissance des flux d'éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers

Résumé

De nombreux sols forestiers français sont acides et pauvres en éléments nutritifs et les forêts françaises font face aujourd'hui à des pressions extérieures croissantes. Ces nouvelles contraintes sont d'ordre nutritionnel et/ou sylvicole et/ou climatique et risquent d'impacter la durabilité des écosystèmes forestiers à faible fertilité minérale. Il est donc très important de comprendre et quantifier les processus qui régissent les cycles des éléments nutritifs dans ces écosystèmes afin de prédire au mieux leurs évolutions possibles face à de telles contraintes et ainsi aider les gestionnaires forestiers à prendre des décisions réfléchies pour assurer leur durabilité.

L'objectif principal de cette thèse était de comprendre le cycle du calcium et du magnésium dans un écosystème forestier productif bien que croissant sur un sol très faiblement pourvu en Ca et Mg. Pour cela, nous avons établi dans un peuplement de hêtre âgé de 35 ans des bilans de flux « entrées-sorties » basés sur des mesures classiques de pools et flux entre 2003 et 2008. Puis une expérience de multi-traçage isotopique (^2H , ^{15}N , ^{26}Mg et ^{44}Ca) a ensuite été conduite: les traceurs ont été apportés à la surface du sol en avril 2010 sous forme soluble et leur progression a été suivie dans l'écosystème jusqu'en mars 2012.

Les résultats ont mis en évidence le rôle primordial que joue la matière organique dans les cycles du Mg et du Ca, en leur conférant notamment un caractère très conservatif. Le ^{26}Mg et le ^{44}Ca apportés ont été captés dans la fine couche de litière au sol puis lentement libérés. Dans les horizons minéraux, la matière organique du sol, qui semble contribuer à la plus grande part de CEC du sol, a fortement contribué à ralentir la migration du Mg et du Ca à travers le sol. Par rapport au Mg, le calcium apporté a été plus intensément retenu dans la litière, et moins intensément lixivie à travers le sol en raison de sa plus grande affinité pour la matière organique.

Malgré les flux préférentiels d'eau mis en évidence par le traçage au ^2H , aucune perte par drainage de ^{26}Mg ou ^{44}Ca n'a été mesurée. Deux années après l'apport, il restait dans la litière 8% du ^{26}Mg et 33% du ^{44}Ca apportés tandis que, respectivement, 52% et 46% ont été retrouvés dans les 10 premiers cm du sol. Les traceurs, rapidement absorbés par les racines fines ont migré dans l'arbre à des vitesses très différentes: les feuilles étaient enrichies en ^{15}N dès le mois suivant l'apport des traceurs, tandis que seuls de très faibles enrichissements en ^{26}Mg (mais pas de ^{44}Ca) ont été mesurés dans la canopée en 2012. Le bilan en 2012 montre les arbres ont absorbé 27% de ^{26}Mg et 20% de ^{44}Ca et qu'ils sont majoritairement concentrés dans les tissus de la base du tronc.

L'utilisation de traceurs isotopiques a permis de mettre en évidence la lenteur de la redistribution de Mg et encore plus de Ca dans l'écosystème, d'une part de la litière vers les sols et d'autre part des racines vers les canopées. Ce comportement est attribué à l'affinité de ces ions pour les charges carboxyliques portées par la matière organique.

Enfin, la dilution isotopique mesurée dans les différents compartiments de l'écosystème à l'issue de deux années a permis de calculer des bilans et ainsi de valider les pertes de Mg calculées par l'approche classique de « bilan de fertilité minérale ». En revanche, les pertes de Ca calculées par cette même approche ont été mises en défaut, démontrant la contribution d'une source externe (absorption par les feuilles, altération...) ou interne (mobilisation du stock des tissus ligneux), non prise en compte dans l'approche classique.

L'ensemble de ces travaux souligne l'intérêt de l'approche « traçage isotopique » en complément des approches conventionnelles afin d'étudier la fertilité minérale des écosystèmes forestiers.

Mots clés : Cycles biogéochimiques, forêt, traçage isotopique, dilution isotopique, calcium, magnésium

A multi-isotopic (^{26}Mg , ^{44}Ca and ^2H) tracing experiment to better understand nutrient cycling in forest ecosystems

Abstract

Many forest soils in France are acid and nutrient poor. French forests endure today increased external constraints which may be nutritional and/or silvicultural and/or climatic. These constraints may strongly impact the sustainability of nutrient-poor ecosystems. It is thus important to understand and quantify the processes which govern nutrient cycling in these ecosystems to better predict soil fertility changes and help forest managers make sound decisions to sustain these ecosystems.

The main objective of this thesis was to study magnesium and calcium cycles in a productive forest ecosystem with low available magnesium and calcium pools in the soils. For this purpose, in a 35-year-old beech stand, we computed input-output nutrient budgets between 2003 and 2008 using conventional approaches to measure nutrient pools and fluxes. A multi-isotopic (^2H , ^{15}N , ^{26}Mg et ^{44}Ca) tracing experiment was then carried out in the same plot: tracers were sprayed on the forest floor in April 2010 as soluble salts, tracer transfer was then monitored in the whole ecosystem until March 2012 (litter-layer, exchangeable pools, soil solutions, above-ground biomass...).

The results evidenced the predominant role of organic matter in the very conservative cycling of Mg and Ca in this nutrient-poor soil. Indeed, the applied ^{26}Mg and ^{44}Ca were very rapidly retained in the fine litter-layer by ion-exchange processes. In the soil profile, most of the CEC was probably due to soil organic matter which played an important role in the retention of Mg and Ca in the soil. Compared to magnesium, calcium was more strongly retained in the litter layer and transferred more slowly in the soil profile because of the higher affinity of calcium for organic CEC. Despite preferential water flow evidenced by the water tracing experiment (^2H), no leaching of ^{26}Mg or ^{44}Ca was observed during the study period. Two years after the application of tracers, 8% of applied ^{26}Mg and 33% of applied ^{44}Ca was still retained in the litter layer while, respectively, 52% and 46% of applied tracers were found in the first 10cm of the soil profile. Tracers were rapidly absorbed by the fine roots but were transferred from the roots to the canopy at very different velocities: leaves were enriched in ^{15}N one month after the application of tracers while only very small ^{26}Mg enrichments and not ^{44}Ca were observed in the canopy in 2012. Tracer budgets in 2012 showed that trees absorbed 27% of ^{26}Mg and 20% of ^{44}Ca and that tracers were mainly concentrated at the base of the bole. The use of isotope tracers evidenced the slow distribution of magnesium and the slower distribution of calcium in the ecosystem, on the one hand from the litter pool to the soil profile and on the other hand from the roots to the canopy. This behavior was attributed to the affinity of the cations for organic matter functional groups such as carboxyl groups.

Finally the isotopic dilution technique of the applied tracers measured in the different ecosystem compartments after two years of monitoring enabled us to validate the Mg losses computed by nutrient budgets. However, Ca depletion suggested by nutrient budgets were proven to be nil thus evidencing the contribution of an external (foliar absorption, weathering) and/or internal (mobilization of nutrients stored in ligneous tissues) sources which are currently not taken into account in conventional approaches.

Overall the results of the *in situ* ecosystem scale multi-isotopic tracing experiment show the added value of the "isotopic tracing" approach to study nutrient pools and fluxes in forest ecosystems in addition to conventional approaches.

Keywords: Biogeochemical cycles, forest, isotopic tracing, isotopic dilution, calcium, magnesium

Avant-propos

La thèse en quelques chiffres

La thèse, nous le savons tous, c'est trois ans. Enfin... Dans mon cas, **3.5 ans** ! Soit 182 semaines ou 1274 jours ou 30 576 heures ou 1 834 560 minutes ou encore 110 073 600 secondes. Autrement dit, c'est long mais je n'ai guère eu le temps de me tourner les pouces et voici pourquoi :

Ma thèse c'est :

- **1138** : L'unité INRA Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers qui m'a accueilli chaleureusement durant tout ce temps. J'insiste sur ce point car cette thèse est le résultat d'un travail d'équipe et la bonne humeur qui règne au sein du BEF a aussi joué un rôle primordial. J'y reviendrai plus tard...
- Calcium **44**, calcium **40**
- Magnésium **26**, magnésium **24**
- **7 679.5** mg de MgO enrichi en ^{26}Mg (**99.3** atom%)
- **4226.1** mg de CaCO_3 enrichi en ^{44}Ca (**96.4** atom%)
- **8 000** mg de NO_3^- enrichi en ^{15}N (99 atom%)
- **80 000 €** de matériel enrichi en ^{26}Mg , ^{44}Ca , ^2H et ^{15}N
- **20 L** de solution de traçage
- Une placette de traçage de **80 m²**
- **48 440** km parcourus (soit 1.21 fois la circonférence de la terre) avec comme destinations : Lincolnville dans l'Etat du Maine aux USA, Prague en République Tchèque, Bari en Italie, Santiago de Compostela en Espagne, Aberdeen en Ecosse, Chambéry, Brest, Montpellier, Toulouse, Paris, les Vosges et le site expérimental de Breuil-Chenué dans le Morvan (34 aller-retours soit 10 200 km, 23% de la distance totale soit aussi environ 240 heures ou 10 jours entiers dans une voiture).
- **43** prélèvements à Breuil
- Plus de **800** échantillons de sol prélevés : **650** extractions (fumigées et non-fumigées) de CEC soit 65L de solution d'acétate d'ammonium à 1 mol.L^{-1} et **650** extractions (fumigées et non-fumigées) de carbone et d'azote.
- **929** échantillons de biomasse végétale minéralisée
- **1 125** heures d'ICP-MS dont 340 en développement de méthodes et 785 pour les analyses d'échantillons
- Plus de **18 695** analyses : **5 197** analyses ICP-MS, **5 106** ICP-AES, **2 527** SKALAR, **2 758** TC-TN, **2 088** pH, **571** analyses deutérium et **448** analyses ^{15}N
- **1** manuscrit : **271** pages, **9** chapitres et **6** articles
- **1** Soutenance : **45** minutes de présentation et **2h15** de question
- **20** pains de campagne achetés pour mon pot de thèse

Remerciements

C'est une sensation étrange que de mettre un point final à cette fabuleuse aventure qui a duré près de trois ans et demi. J'ai l'impression que ce n'était qu'hier. Je rentrais dans le bureau d'Etienne Dambrine. Il me fit assoir dans son fameux « rocking-chair » et me parla de son idée folle et rêvée depuis toujours de pulvériser des isotopes dans la forêt. Je ne savais pas exactement à cet instant dans quoi je mettais les pieds mais à présent, je peux dire que je n'ai absolument aucun regret d'avoir choisi cette voie. Plus de trois ans sont passés, j'ai passé de si bons moments, j'ai appris tant de choses et je suis devenu quelqu'un de profondément heureux et j'aimerais remercier chaque personne qui a contribué à cette aventure (je m'excuse auprès des personnes que j'aurais le malheur d'oublier).

Je souhaite tout d'abord remercier tous les organismes financeurs de ce travail de thèse sans qui ce travail de thèse n'aurait pas pu se faire : l'INRA et le contrat jeune scientifique (CJS), la région Lorraine et les Fonds Européens de Développement Régional (FEDER), le GIP-Ecofor et la Zone Atelier Moselle.

Merci aux membres de mon jury de thèse, Jean-Claude Gégout, Jérôme Balesdent, Laurent Augusto, Christian France Lanord et particulièrement à Dale Johnson qui a fait le long voyage du Nevada aux Etats-Unis pour assister à ma soutenance.

Je souhaite remercier du fond du cœur Etienne Dambrine et Arnaud Legout qui ont mis en place ce projet de thèse. Merci pour tout le temps que vous m'avez consacré, merci de m'avoir fait confiance, merci de m'avoir fait découvrir la recherche et de m'avoir aidé à trouver ma voie. Merci pour tous les bons moments passés ensemble à Nancy ou à Chambéry. Mon seul regret est de ne pas avoir pu passer plus de ces bons moments avec toi Etienne. Un très grand merci à Arnaud qui a vraiment été un encadrant exceptionnel, toujours de bon conseil et toujours prêt à me consacrer une minute ou deux. Et on disait qu'un breton ne pourrait jamais encadrer un normand... ! Je voudrais aussi remercier Jacques Ranger et Bernd (the best) Zeller qui ont, eux aussi, toujours su trouver du temps pour me donner d' « excellents » conseils.

Une autre personnalité indispensable : Mr BEN ! Merci pour toutes ces heures de torche, pour toutes ces heures de grattage de tête pour développer les méthodes d'analyses sur ICP-MS, merci d'avoir toujours trouvé une solution pour les (fréquentes) pannes et surtout merci pour ta bonne humeur et la collocation du bureau ! Merci à Gringo Emile pour tous les bons moments. Le bureau est bien triste et vide sans toi. Merci à Serge pour son aide inestimable tant au labo que sur le terrain. Merci pour le fameux « saucisbonne » après nos longues journées dehors dans le froid et tous tes e-mails dont le contenu ne peut être révélé ici !

Merci à tous ceux qui m'ont aidé avec tous mes échantillons : Séverine Bienaimé pour le SKALAR, Claude Bréchet pour le deutérium, Christian Hossan pour le ¹⁵N, Marie-Clotilde (sans « h »), Gaëtan, Gaëtan (bis), Léo et Noëlle Bouxirot. Je tiens aussi à remercier l'ensemble du BEF pour toute l'aide et toute la bonne humeur partagée autour du fameux café de Nathalie qui divise certes les opinions mais est tellement fédérateur ! Merci à tous les autres thésards Astrid (pour les trajets à vélo et tous les bons moments passés ensemble à l'INRA ou au Capri !), Pierre-Joseph, Christelle (pour les minouches), Noémie (d'avoir supporté mes blagues douteuses !), Karna (thanks for all your help to get my trip to Sweden ready !), Antoine (pour les parties de pétanques en nocturne), Emeline, Jade, Léa, et Julien. Merci à Pascal, Gilles, Louissette, Carine, Perrine, Monsieur Nys, Isabelle, Nathalie, Jacqueline, Laurent, Delphine (merci pour ta bonne humeur, ton sourire perpétuel et merci à Matthieu) Marie-Pierre et Christophe.

Je souhaite aussi remercier Andy Midwood et Caro-Ann Craig du James Hutton Institute à Aberdeen en Ecosse pour leur chaleureux accueil dans leurs locaux, tout le temps qu'ils m'ont consacré et pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté pour développer les méthodes d'analyses de ratios isotopiques sur ICP-MS.

Je remercie aussi l'équipe dendrochimie d'EEF : Stéphane Ponton, Christophe « Lu » Rose avec une pensée toute particulière à Nicolas Métral que je connaissais certes peu mais le peu que je connaissais, j'aimais beaucoup. Il nous manquera à tous.

Et Jérôme... Ah Jérôme ! Vieux frère ! Comment te remercier pour tout sans faire une tartine de 50 pages ! J'ai passé tant de bons moments avec toi, on a tant ri ! Merci pour la musique, la photo, une paire de superbe enceintes, la cloison de ta cuisine, la « Jean Bart », le doc Emet Brown, les discussions loufoques et tout le bricolage ! Te rencontrer a vraiment rendu ces 3 ans et demi extraordinaire. Ton amitié m'est très précieuse. Je voulais aussi remercier Cécile et tes deux petites princesses Lili et Lulu pour avoir été ma famille d'accueil pendant ces trois ans. J'espère que nous aurons dans le futur l'occasion de continuer à être débile ensemble ! Et il faudra bien tester si l' « effet Greg » fonctionne encore dans 10 ans !

J'adresse un grand merci à toute ma famille qui m'a supporté durant ces trois ans et a surtout supporté mon absence prolongé. Je m'en excuse. Enfin, un grand merci à ma petite architecte qui m'a accompagné à New-York et durant cette dernière année.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Avant-propos	7
Remerciements	9
Table des matières	13
Chapitre I – Introduction Générale	19
I. Cycles biogéochimiques et nutrition des plantes	21
II. La fertilité des sols forestiers face aux différents changements	23
III. Outils « conventionnels » pour quantifier la pérennité de la fertilité chimique et limites des approches	27
III.1. Comparaison des stocks de nutriments à deux dates différentes	27
III.2. Calcul de bilans de flux « entrées-sorties »	28
III.3. La modélisation des cycles biogéochimiques du Mg et du Ca	29
III.4. Limites des approches bilans de flux « entrées-sorties » et modélisation	30
III.4.1. Immobilisation dans la biomasse	31
III.4.2. Dépôts atmosphériques	31
III.4.3. Altération des minéraux du sol	31
III.4.4. Pertes par drainage profond	32
III.4.5. Estimation de l'incertitude autour des différents termes du bilan de flux « entrées-sorties »	33
III.4.6. Limites des connaissances sur la relation sol-plante	33
IV. Utilisation de l'outil isotopique	34
IV.1. Isotopie naturelle	34
IV.2. Enrichissement, traçage et dilution isotopique	37
IV.2.1. Principe des techniques de marquage, traçage et dilution isotopique	37
IV.2.2. Traçage du prélèvement racinaire et de la translocation	37
IV.2.3. Traçage du recyclage interne à la plante	37
IV.2.4. Traçage isotopique à l'échelle de l'arbre	38
IV.3. Mesures des compositions isotopiques du magnésium et du calcium	38
IV.3.1. Le fractionnement instrumental	40
IV.3.2. Les interférences spectrales	41
V. Objectifs de la thèse	42
VI. Références bibliographiques	43
Chapitre II – Matériels et Méthodes	53
I. Description du site	55
II. Installations permanentes	57
III. Expérience de multi-traçage isotopique	58
IV. Suivi, échantillonnages réalisés et méthodes analytiques	60
IV.1. Echantillonnage des pluies, pluviolessivats, écoulements de tronc et solutions de sol	60
IV.2. Echantillonnage des sols et de l'humus	62
IV.3. Echantillonnage de la biomasse végétale	62
IV.4. Analyse de la composition chimique et isotopique des échantillons	63
IV.5. Notation des rapports isotopiques et calculs de stocks de traceurs dans les compartiments de l'écosystème	65
Reference List	67
Chapitre III – Traçage et modélisation du cycle de l'eau	69
I. Résumé de l'étude	71
I.1. Introduction	71
I.2. Principaux résultats	71
I.3.1. Mise en évidence de flux préférentiels d'eau dans le sol	71
I.3.2. Quantification des flux préférentiels d'eau dans le sol	72
I.3.3. Incidence possible des flux préférentiels d'eau sur les flux de drainage de nutriments	72

II. Tracing and modeling preferential flow in a forest soil - potential impact on nutrient leaching	75
Abstract.....	77
1. Introduction	77
2. Materials and methods	78
2.1 Study site	78
2.2 Soil physical properties	78
2.3 Weather data	78
2.4 Tracing experiment and sample analysis.....	79
2.5 Hydrological models.....	79
2.6 Modeling preferential flow	79
2.7 Deuterium mass balance and nutrient leaching fluxes.....	80
3. Results.....	80
3.1 Breuil-Chenué weather data validation.....	80
3.2 Tracing water fluxes with deuterated water	80
3.2.1. Estimation of flow velocities	81
3.2.2. Modeling water and solute fluxes without preferential flow	81
3.3. Modeling water and solute preferential flow.....	81
3.4 Impact of preferential flow paths on the deuterium mass balance and nutrient leaching fluxes	81
4. Discussion	82
4.1 Water tracing experiment and evidence of preferential flow	82
4.2 Hydrological modeling and preferential flow at the soil profile scale	84
4.3 Comparing HYDRUS-1D and BILJOU	85
4.4 Consequences on the nutrient drainage flux	85
5. Conclusion.....	86
Acknowledgments.....	86
Reference list	86
Annexe	88
.....	91

Chapitre IV – Approches « conventionnelles » des cycles biogéochimiques et de l'évolution des réserves de Ca et Mg du sol dans la placette de hêtre..... 91

I. Résumé de l'étude.....	93
I.1. Introduction	93
I.2. Principaux résultats.....	94
I.2.1. Evolution des réserves de Mg et Ca du sol entre 1974 et 2001.....	94
I.2.2. Bilans de flux « entrées-sorties » sur la période 2003-2008.....	94
I.2.3. Cycles biogéochimiques du Mg et du Ca dans le peuplement de hêtre	95
II. Assessing Mg and Ca depletion from broadleaf forest soils and potential causes - A case study in the Morvan mountains	97
Abstract.....	99
1. Introduction	99
2. Material and methods.....	100
2.1. Study site.....	100
2.2. Data collection	100
2.2.1. Soil and humus data	100
2.2.2. Solution monitoring and analysis	101
2.2.3. Biomass data	102
2.3. Nutrient fluxes and input-output budget calculation.....	103
2.3.1. Nutrient budget principle.....	103
2.3.2. Atmospheric deposition	103
2.3.3. Weathering flux.....	104
2.3.4. Net uptake.....	104
2.3.5. Drainage losses.....	104
2.4. Statistical analysis	104
3. Results.....	105
3.1. Soil nutrient pool change over 1974-2001	105
3.2. Atmospheric deposition and soil solution composition	105
3.3. Nutrient fluxes and input-output budgets	105
3.4. Foliar nutrient concentration	105
4. Discussion	105
4.1. Evidence of past and ongoing soil Mg and Ca depletion	105
4.1.1. Past trends assessed from soil data comparison – 1974 to 2001	105
4.1.2. Actual trends assessed with nutrient budgets – 2003 to 2008.....	107
4.1.3. Potential causes to soil Mg and Ca depletion	108
4.2. Limits to conventional approaches to soil nutrient depletion	108
4.2.1. Soil nutrient pool size change measured by soil samplings.....	108
4.2.2. Input-output nutrient budgets	108
4.3. How the ecosystem may cope with such low levels of nutrients?	109
4.3.1. Discrepancies in the plant-soil relation	109

4.3.2. Evidence of rapid and conservative base cation nutrient cycling	109
Conclusion.....	109
Acknowledgements.....	110
Reference list	110
Chapitre V – Développement méthodologique pour l’analyse des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ par ICP-MS. Premiers résultats de l’expérience de traçage isotopique	115
<i>I. Résumé de l’étude.....</i>	<i>117</i>
I.1. Introduction	117
I.2. Principaux résultats.....	118
I.2.1. Développement et validation des méthodes d’analyses isotopiques.....	118
I.2.2. Résultats préliminaires de l’expérience de multi-traçage isotopique.....	119
I.2.2.1. Transfert vertical de traceurs dans le sol.....	119
I.2.2.2. Prélèvement racinaire des traceurs dans le sol	119
<i>II. $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ isotope ratio analysis with ICP-MS – Method development and validation.....</i>	<i>121</i>
Introduction	122
Material and methods.....	122
Analytical biases.....	122
Precision, repeatability and accuracy.....	123
Instruments.....	123
Mass bias correction methods.....	124
Instrument comparison statistical tool	124
Results.....	124
Detector linearity.....	124
Total mass bias correction methods on ICP-MS.....	125
Instrument precision, accuracy and repeatability.....	126
Discussion	127
Conclusion.....	129
Reference list	130
<i>III. Mg and Ca root uptake and vertical transfer in soils assessed by an in situ ecosystem-scale multi-isotopic (^{26}Mg & ^{44}Ca) tracing experiment in a beech stand (Breuil-Chenue, France).....</i>	<i>133</i>
Abstract.....	135
Introduction	136
Materials & methods	137
Study site	137
Monitoring equipment.....	137
Tracing experiment and elemental sample analysis.....	137
Measuring $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ with ICP-MS.....	138
IsoMod – modeling isotope dilution of initial spike with time	139
Input and output fluxes.....	139
Model description	139
Results.....	141
^{26}Mg and ^{44}Ca labeling of the pool of exchangeable cations in the organic and soil layers.....	141
Mg and Ca root uptake	142
Discussion	142
Isotopic labeling and natural isotope variations: two complementary approaches.....	142
A two velocity vertical transfer of cations in the soil profile	143
Mg and Ca tracer retention and release in the humus layer	143
Mg and Ca tracer rapid transfer.....	143
Mg and Ca root uptake	144
Acknowledgements.....	144
References	145
Chapitre VI – Transfert vertical des traceurs dans le profil de sol	149
<i>I. Résumé de l’étude.....</i>	<i>151</i>
I.1. Introduction	151
I.2. Principaux résultats.....	151
I.2.1. Rétention et remobilisation du magnésium et du calcium dans la couche de litière au sol.....	151
I.2.2. Rétention du magnésium et du calcium dans le sol	152
I.2.3. Différents types de transferts de magnésium et de calcium dans le profil de sol	152
<i>II. The role of soil organic matter in the biogeochemical cycling of Mg and Ca in forest ecosystems on base poor soils. 153</i>	<i>153</i>
Abstract.....	154
1. Introduction	155
2. Material and methods.....	156
2.1. Study site.....	156
2.2. Multi-isotopic tracing experiment design	157

2.2.1. Application of the stable isotope tracers.....	157
2.2.2. Isotope ratio notation	158
2.3. Measuring tracers in the ecosystem.....	158
2.3.1. Soil solution sampling.....	158
2.3.2. Sampling of the litter and soil layers	159
2.3.3 Sample analysis methods	160
2.4. ^{26}Mg and ^{44}Ca pool and flux calculation methodology.....	160
3. Results.....	160
3.1. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers in the litter-layer	160
3.2. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers in the soil.....	161
3.3. Monitoring of soil solution	163
3.3.1. Soil solutions collected with zero-tension lysimeters at 0 and 10cm depth.....	163
3.3.2. Soil solutions collected with tension-cup lysimeters at 15 cm and 30 cm depth.....	165
3.4. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer fluxes in the soil profile.....	167
4. Discussion	168
4.1. Retention and release of ^{26}Mg and ^{44}Ca from the litter-layer	168
4.1.1. High retention of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the OL-layer of the litter layer	168
4.1.2. Slow release of ^{26}Mg and ^{44}Ca from the litter-layer	168
4.2. Vertical transfer of Mg and Ca from the topsoil to deeper soil horizons	169
4.2.1. The soil is a chromatographic column	169
4.2.2. Evidence of rapid and slow transfer of Mg and Ca tracers	171
4.4. Influence on the nutrient leaching flux	172
5. Conclusion.....	173
6. Reference list	174

Chapitre VII – Prélèvement et allocation des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans la biomasse aérienne des arbres..... 177

<i>I. Résumé de l'étude.....</i>	<i>179</i>
I.1. Introduction	179
I.2. Principaux résultats.....	179
I.2.1. Cartographie du prélèvement de magnésium et de calcium dans le profil de sol.....	179
I.2.2. Translocation du magnésium et du calcium des racines vers la canopée.....	180
<i>II. Tracing Mg and Ca uptake and allocation in a beech stand on base-poor soil with ^{26}Mg and ^{44}Ca.....</i>	<i>183</i>
1. Introduction	184
2. Material and methods.....	185
2.1. Study site.....	185
2.2. Multi-isotopic tracing experiment design	186
2.2.1. Application of the stable isotope tracers.....	186
2.2.2. Isotope ratio notation	186
2.3. Measuring tracers in the ecosystem.....	187
2.3.1. Monitoring ^{26}Mg and ^{44}Ca in soil solution.....	187
2.3.2. Monitoring ^{26}Mg and ^{44}Ca in the litter and soil layers	188
2.3.3 Sample analysis methods	188
2.4. Immobilization of ^{26}Mg and ^{44}Ca in above-ground biomass	188
2.5 Modeling ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake by trees.....	190
2.5.1. Water mass flow based model	190
2.5.2. Exchangeable pool source base model.....	190
3. Results.....	191
3.1. Sources of ^{26}Mg and ^{44}Ca for tree uptake in the soil profile	191
3.1.1. Mg and Ca uptake based on water mass flow	191
3.1.2. Mg and Ca uptake based on exchangeable pool sources	192
3.2. Translocation from root to crown.....	193
3.2.1. Monitoring fine root tracer concentrations	193
3.2.2. Monitoring foliar tracer concentration	194
3.2.3. Mapping of ^{26}Mg and ^{44}Ca in above-ground ligneous tree organs.....	195
4. Discussion	197
4.1 Mapping Mg and Ca uptake in the soil profile	197
4.1.1. Mg and Ca uptake was not related to water mass flow	197
4.1.2. The litter layer was the main Mg and Ca source for tree uptake	198
4.2. Translocation of base cations from the roots to the canopy.....	199
4.2.1. The transpiration xylem sap stream is a chromatography column.....	199
4.2.2. Radial transfer of Mg and Ca	200
6. References	202
Supplementary Material	206

Chapitre VIII – Bilans des traceurs dans l'écosystème deux ans après leur application..... 209

<i>I. Résumé de l'étude.....</i>	<i>211</i>
I.1. Introduction	211

I.2. Principaux résultats.....	211
I.2.1. Evolution des réserves échangeables de magnésium et de calcium dans le sol.....	211
I.2.2. Bilans des traceurs dans les différents compartiments de l'écosystème.....	212
<i>II. Fate of calcium and magnesium rainfall inputs in a forest ecosystem on base poor soil assessed with a isotopic tracing experiment (²⁶Mg and ⁴⁴Ca).....</i>	<i>213</i>
Abstract.....	214
Introduction.....	215
Material and methods.....	216
Study site.....	216
Experimental design and conventional approaches.....	217
Data collection.....	217
Mg and Ca inputs and outputs in 2010-2011.....	218
Multi-isotopic tracing experiment design.....	218
Application of the stable isotope tracers.....	218
Isotope ratio analysis and notation.....	219
²⁶ Mg and ⁴⁴ Ca tracers in the ecosystem.....	219
Measuring tracer in the litter and soil layers.....	219
Immobilization of ²⁶ Mg and ⁴⁴ Ca in tree biomass.....	220
Applying the isotopic dilution technique to the whole-ecosystem to estimate exchangeable Mg and Ca pools in 2012.....	220
Principle.....	220
Hypotheses tested.....	221
Tracer recovery and uncertainty in tracer pool estimation.....	223
Results.....	224
Base cation microbial immobilization.....	224
Tracer Immobilization in tree biomass.....	224
Mg and Ca pool size change tested with the isotopic dilution technique.....	226
²⁶ Mg and ⁴⁴ Ca tracer recovery.....	226
Discussion.....	227
Soil exchangeable Mg and Ca pool change over time.....	227
Fate of Mg and Ca tracers in the forest ecosystem.....	229
Mg and Ca retention in the litter-layer and on the soil CEC.....	229
Mg immobilization in soil microbial biomass.....	230
Conclusion.....	232
Reference list.....	233
Chapitre IX – Synthèse et Conclusions Générales.....	237
I. Apports des approches conventionnelles à l'étude des flux d'éléments minéraux.....	239
I.1. Evolution des réserves en Mg et Ca du sol entre 1974 et 2008.....	239
I.1.1. Synthèse des évolutions.....	239
I.1.1.1. Evolution des réserves de Mg et Ca du sol entre 1974 et 2001.....	239
I.1.1.2. Bilans de flux « entrées-sorties » sur la période 2003-2008.....	240
I.1.2. Causes potentielles des pertes de Ca et Mg depuis la coupe-à-blanc du peuplement précédent.....	240
I.2. Cycles biogéochimiques du magnésium et du calcium illustrés à partir de l'approche classique de la mesure des réserves et flux.....	241
I.3.1. Importance des différents flux dans les cycles du magnésium et du calcium.....	241
I.3.2. Importance du recyclage interne.....	242
I.3.3. Autres sources potentielles de magnésium et de calcium dans l'écosystème.....	242
I.3.4. Autres sources potentielles de magnésium et de calcium « extérieures » à l'écosystème.....	244
II. Incorporation des traceurs (²⁶ Mg et ⁴⁴ Ca) dans les cycles biogéochimiques du Mg et du Ca.....	244
II.1. Rétention dans la couche de litière au sol.....	245
II.2. Immobilisation de magnésium dans la biomasse microbienne du sol.....	246
II.3. Transfert vertical dans le profil de sol.....	247
II.3.1. Différents types de transfert dans le sol.....	247
II.3.2. Pertes par drainage.....	249
II.4. Prélèvement de Mg et Ca par les arbres.....	249
II.4.1. Sources de Mg et Ca pour le prélèvement racinaire.....	249
II.4.2. Prélèvement d'eau et de cations nutritifs.....	252
II.4.3. Cartographie verticale du prélèvement des traceurs par l'arbre.....	254
II.5. Translocation des racines vers la canopée.....	256
II.5.1. Les vaisseaux du xylème sont une colonne chromatographique.....	256
III. Test des bilans de flux « entrées-sorties » par dilution isotopique.....	259
IV. Bilans des traceurs isotopiques dans l'écosystème.....	260
V. Conclusions.....	262
VI. Perspectives.....	264
VI.1. Couplage des cycles du magnésium et du calcium avec le cycle de l'azote.....	264
VI.2. Modélisation de l'expérience de traçage et dilution isotopique.....	264

VI.3. Suivi de la placette expérimentale sur le moyen-terme.....	265
VI.4. Les « entrées » de magnésium et de calcium dans l'écosystème	265
VI.4.1. Essai de quantification ex situ du flux d'altération.....	265
VI.4.2. Expérience d'absorption foliaire	266
VI.5. Matière organique et cycles du magnésium et du calcium	266
VI.5.1. Pool échangeable de la litière au sol.....	266
VI.5.2. Cartographie des traceurs à l'échelle micro ou nanométrique	266
VI.5.3. Expérience de décomposition de litière	267
VI.6. Recyclage de magnésium et de calcium interne à l'arbre	267
VI.7. Applicabilité de la technique de dilution isotopique pour estimer des évolutions de stocks dans les sols de placettes permanentes.....	268
VI. Références.....	269
Liste des figures.....	273
<i>Chapitre I : Introduction générale</i>	<i>273</i>
<i>Chapitre II : Matériels et méthodes.....</i>	<i>273</i>
<i>Chapitre III : Traçage et modélisation du cycle de l'eau</i>	<i>274</i>
<i>Chapitre IV : Approches « conventionnelles » des cycles biogéochimiques et de l'évolution des réserves de Ca et de Mg du sol dans la placette de hêtre</i>	<i>274</i>
<i>Chapitre V : Développement méthodologique pour l'analyse des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ par ICP-MS. Premiers résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique</i>	<i>275</i>
<i>Chapitre VI : Transfert vertical des traceurs dans le profil de sol</i>	<i>275</i>
<i>Chapitre VII : Prélèvement et allocation des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans la biomasse aérienne des arbres..</i>	<i>276</i>
<i>Chapitre VIII : Bilans des traceurs dans l'écosystème deux ans après leur application</i>	<i>276</i>
<i>Chapitre IX : Synthèse et conclusions générales.....</i>	<i>277</i>
Liste des tableaux.....	279
<i>Chapitre III : Traçage et modélisation du cycle de l'eau</i>	<i>279</i>
<i>Chapitre IV : Approches « conventionnelles » des cycles biogéochimiques et de l'évolution des réserves de Ca et de Mg du sol dans la placette de hêtre</i>	<i>279</i>
<i>Chapitre V : Développement méthodologique pour l'analyse des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ par ICP-MS. Premiers résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique</i>	<i>280</i>
<i>Chapitre VI : Transfert vertical des traceurs dans le profil de sol</i>	<i>280</i>
<i>Chapitre VII : Prélèvement et allocation des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans la biomasse aérienne des arbres..</i>	<i>280</i>
<i>Chapitre VIII : Bilans des traceurs dans l'écosystème deux ans après leur application</i>	<i>281</i>



Chapitre I – Introduction Générale

I. Cycles biogéochimiques et nutrition des plantes

Dans les écosystèmes forestiers, la nutrition des plantes repose sur les pools et les flux d'éléments minéraux entre ces pools (« cycles biogéochimiques »). Le renouvellement des pools de nutriments dans le sol est assuré par les apports atmosphériques, la libération des éléments minéraux par minéralisation des litières et l'altération des minéraux du sol. Cette dernière composante est plus complexe à étudier mais est aussi la plus importante pour la durabilité de la fertilité chimique des sols forestiers. La fertilité chimique des sols forestiers repose en grande partie sur le recyclage interne ou cycle biologique des éléments minéraux : prélèvement, allocation dans les organes des arbres, récréation foliaire, chute de litière et décomposition de la litière au sol. Un schéma descriptif détaille les différents flux d'éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers (Figure I-1).

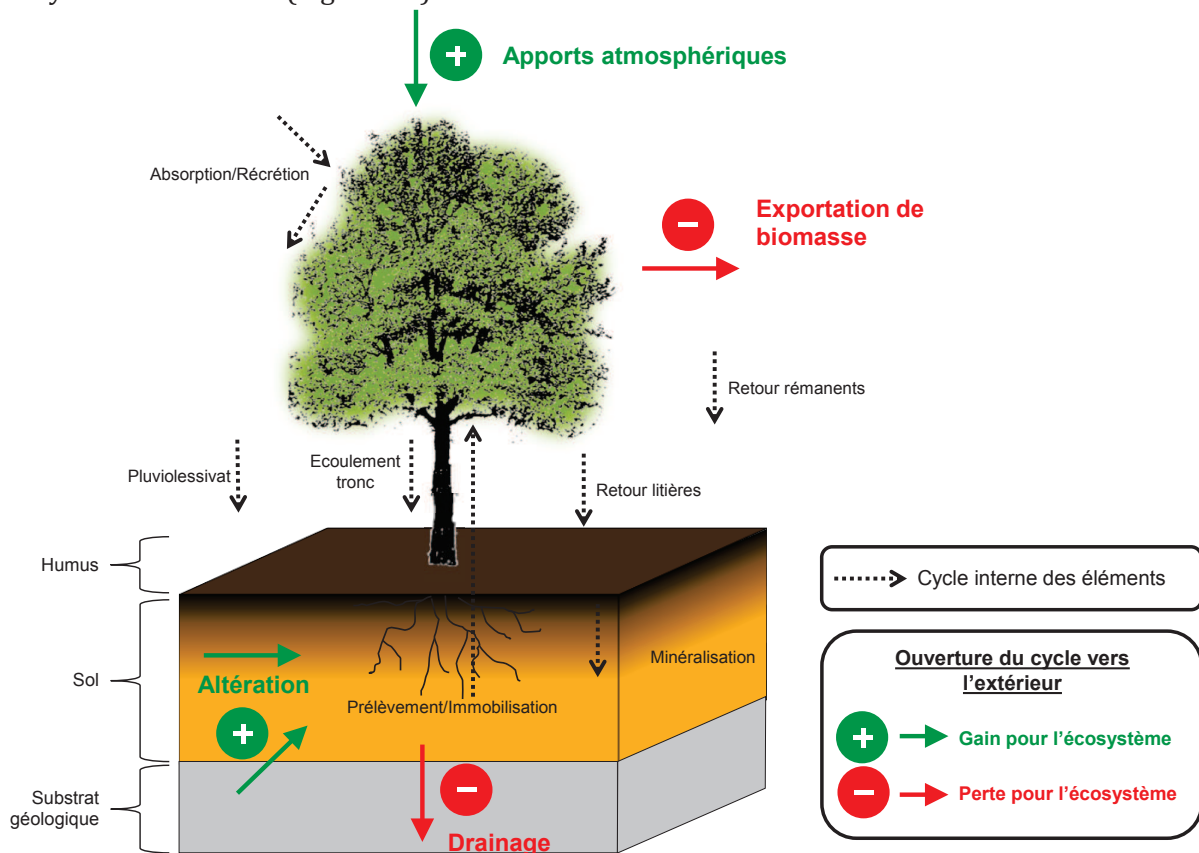


Figure I-1: Schéma récapitulant les principaux flux d'éléments chimiques dans les écosystèmes forestiers (adapté de Legout 2008)

Le magnésium (Mg) et le calcium (Ca) sont deux éléments de la famille des alcalino-terreux. Dans la plante, le magnésium et le calcium sont tous deux des cations bivalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) et sont essentiels à sa nutrition. Le magnésium est nécessaire pour rendre fonctionnelle la molécule de chlorophylle. Les concentrations intracellulaires de magnésium régulent les courants ioniques à travers les membranes des chloroplastes et de la vacuole. Le magnésium joue aussi un rôle important dans le métabolisme cellulaire (ARN polymérase, ATPases, protéine kinases, phosphatases...) (Marschner 1995; Shaul 2002). Le rôle du calcium dans les plantes est essentiellement structural. En effet, on trouve une forte concentration en calcium dans la paroi cellulaire (calcium lié à la pectine). Cependant le calcium a d'autres rôles tel

qu'équilibrer les charges ioniques dans la vacuole ou messenger intracellulaire dans le cytosol (Marschner 1995; McLaughlin and Wimmer 1999; White and Broadley 2003).

Le prélèvement racinaire de Mg et Ca à partir des solutions de sol est un processus en deux grandes étapes : le transport de Mg et Ca de la solution de sol à la surface des racines et le transport de Mg et Ca de la surface des racines vers les parties internes de la plante. Le transport de Mg et Ca de la solution de sol à la surface des racines est en majeure partie assuré par le flux de masse d'eau résultant de la transpiration foliaire (Barber 1995; Oliver and Barber 1966). Les cations migrent ensuite radialement à travers les tissus du cortex racinaire vers les vaisseaux conducteurs du xylème par voie transmembranaire, symplasmique et/ou apoplasmique (Figure I-2). La voie apoplasmique semble favorisée jusqu'à la bande de Caspary (Kuhn et al. 2000). Le transport de la bande de Caspary aux vaisseaux du xylème requière une voie transmembranaire (transport passif par diffusion à travers des canaux ionique ou transport actif par pompe transmembranaire). Le transfert du Mg et du Ca dans les vaisseaux du xylème suit le flux de sève ascendant, il est influencé par le gradient de potentiel hydrique qui résulte de l'activité des stomates (Aloni et al. 1998; Marschner 1995; Taiz and Zeiger 2010). Le Ca s'accumule principalement au sein des organes de la plante riches en pectine dont le rôle est d'assurer la structure des plantes (racine primaire et tiges). Une part non négligeable atteint aussi les feuilles. Le Ca s'accumule dans la plante sous forme libre, liée ou sous forme de cristaux d'oxalate de calcium. Les cristaux d'oxalate de Ca permettent de réguler la teneur en Ca dans les végétaux pour éviter qu'elle ne soit trop élevée. Dans ce cas, les oxalates de Ca vont avoir un rôle de détoxification vis à vis du Ca. Sous certaines conditions, les oxalates de Ca formés au cours de la vie des plantes peuvent être dissous pour faire face à une carence nutritive en Ca (Franceschi and Nakata 2005; Nakata 2003).

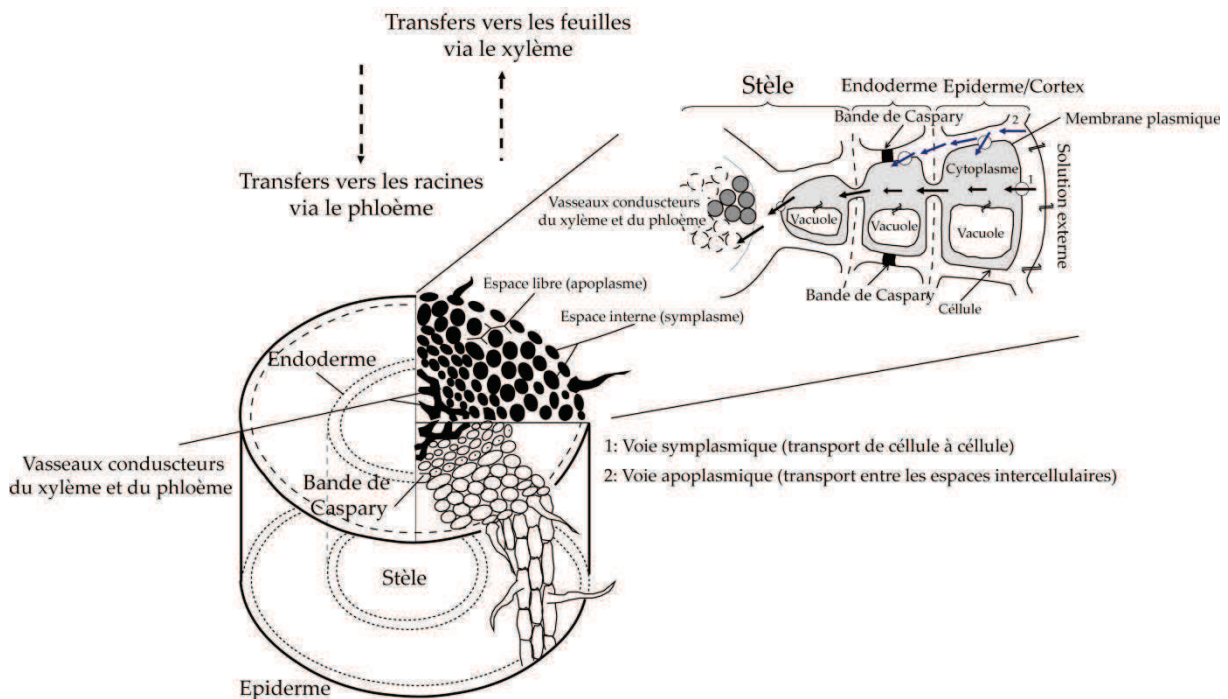


Figure I-2 : Coupes transversale et longitudinale d'une racine décrivant les mouvements des cations de la solution externe aux vaisseaux conducteurs de la plante. Extrait de Bolou Bi (2009)

Dans les écosystèmes forestiers, le magnésium et le calcium ont aussi un rôle majeur dans le sol. Leur présence sur la capacité d'échange cationique influe directement sur le taux de saturation et le pH du sol. En tant que cations divalents, ils participent à la liaison de particules de sol chargées négativement (par exemple, argiles ou composés organiques) et stabilisent ainsi les agrégats de sol et la structure du sol. Le calcium est aussi essentiel pour l'activité biologique du sol d'organismes tels que les lombrics (Edwards and Bohlen 1996) qui influe sur la décomposition et l'incorporation au sol de la litière.

II. La fertilité des sols forestiers face aux différents changements

La fertilité d'un sol forestier est la somme des facteurs physiques, chimiques et biologiques qui détermine la capacité à produire de la biomasse forestière (Ranger and Turpault 1999). La fertilité chimique se décline en fertilité à court et à moyen/long terme. La fertilité à court terme est définie par les stocks de nutriments disponibles dans l'écosystème. Les stocks de nutriments disponibles sont les stocks directement accessibles par les plantes : pools de cations nutritifs échangeables, cations nutritifs dans la solution du sol... La fertilité chimique du sol peut se mesurer par des analyses de sol et/ou le suivi des éléments minéraux dans la solution du sol. La fertilité à moyen/long terme est définie par la capacité à renouveler le pool de nutriments disponibles.

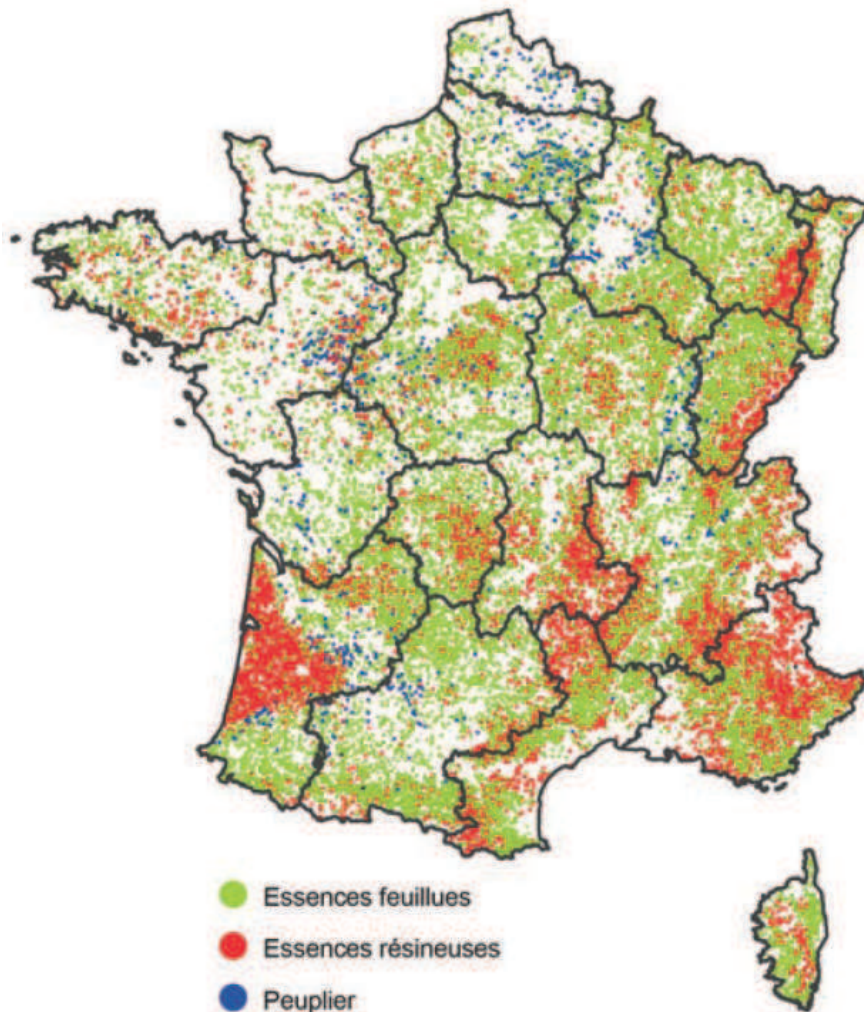
En France, les surfaces boisées couvrent 16,9 millions d'hectares. Les peuplements de feuillus purs représentent 59% (8,9 millions d'hectares) de cette surface. La répartition géographique des types d'essences (feuillus, résineux et peuplier) est présentée dans la Figure I-3. Le hêtre est la seconde essence feuillue de la forêt française, couvrant 1,4 millions d'hectares c'est-à-dire 9 % des surfaces françaises boisées (FCBA 2012). Le hêtre joue un rôle socio-économique important avec un poids fort dans la filière bois : 23 % du bois d'œuvre de feuillus et 10 % du bois d'œuvre total.

La fertilité des sols forestiers a longtemps été considérée comme le résultat d'une interaction complexe entre le climat, la roche mère et la végétation, avec un rôle particulier accordé aux pratiques forestières, améliorantes ou dégradantes. Durant les années 1980, des dépérissements forestiers ont été observés en Europe et en France (plus particulièrement dans le massif des Vosges). Une augmentation des dépérissements a été observée dans les peuplements de hêtre sur station à faible fertilité minérale (Nageleisen and Huart 2005; Nageleisen and Reuter 2007). En 2010, dans le département des Vosges (88), des cartes de besoins en nutriments (Mg, Ca, K et P) ont été produites pour les forêts de 13 communes de la Vôge (soit environ 12000 ha). Cette expertise a débouché sur l'amendement par hélicoptère de plus de 2000 hectares de hêtraies en 2011 (Nys et al. 2010).

Il a été démontré que les apports atmosphériques acides ont fortement contribué à acidifier les sols formés sur des roches mères pauvres en éléments minéraux (granites ou grès), ont accentué les pertes en bases échangeables du sol (Landmann and Bonneau 1995) et favorisé l'apparition de carences magnésiennes. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont constaté une augmentation de la croissance forestière sur le long-terme. L'augmentation de la température

moyenne et les dépôts atmosphériques d'azote sont considérés comme les principaux responsables de cette augmentation.

Répartition des formations boisées en France par type d'essences



Source : Base de données IFN - 2012 ; Traitement FCBA 2012

Figure I-3 : Carte de répartition des formations boisées en France par type d'essences (FCBA 2012)

Cette problématique d'acidification/eutrophisation des sols forestiers liée à la pollution anthropique et ses conséquences sur la fertilité chimique du sol a été observée dans de nombreux pays européens et sur le continent Nord-Américain. Une description détaillée des processus d'acidification des sols et des eaux de surface est donnée dans Reuss and Johnson (1986).

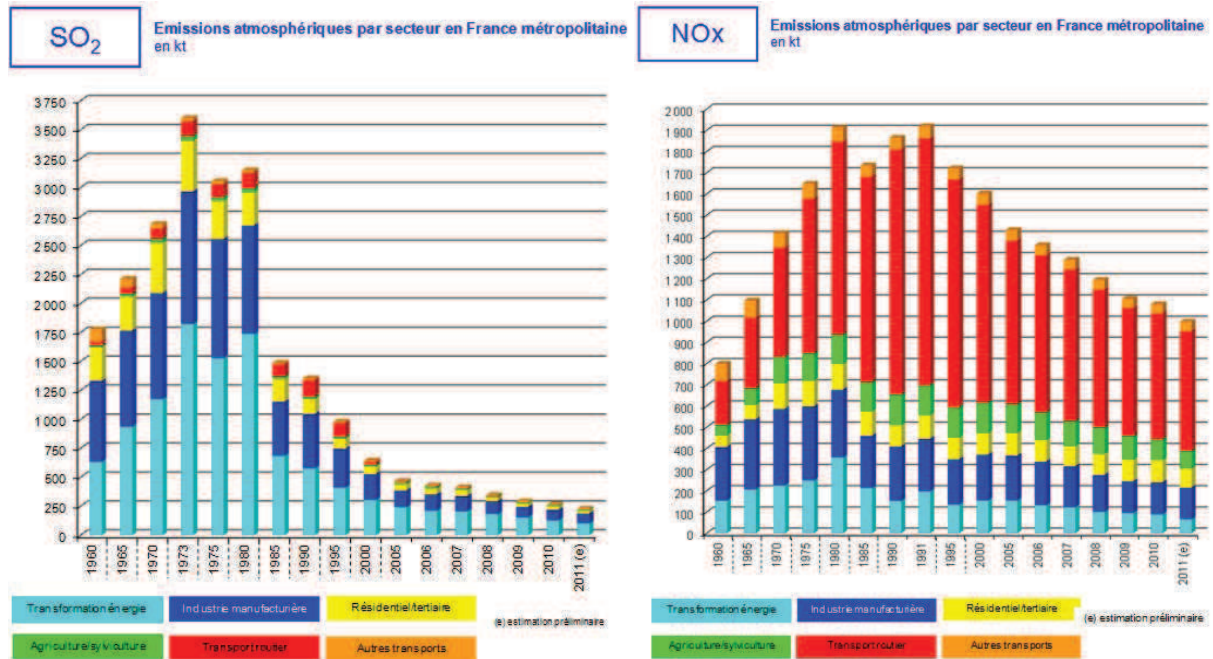


Figure I-4 : Evolution des émissions d'oxydes de soufre et d'azote à l'échelle de la France entre 1960 et 2011 (CITEPA)

Depuis les années 1980 et suite à la « United Nations Conference on the Human Environment » en 1972 et la « Convention on Long-range Transboundary Air Pollution » en 1979, les émissions d'oxydes de soufre et d'azote ont fortement diminuées. En conséquence, les dépôts de sulfates sur les écosystèmes forestiers ont aussi fortement diminués en Europe (Barrett et al. 2000; Boxman et al. 2008; Cooper 2005; Meesenburg et al. 2009; van der Heijden et al. 2011; Vuorenmaa 2004). L'acidité des dépôts atmosphériques ayant diminué, une restauration au moins partielle de ces écosystèmes acidifiés était attendue. Cependant, la baisse de l'acidité des dépôts a souvent été accompagnée d'une baisse des apports en cations nutritifs (Ca, Mg, K...) (Hedin and Likens 1996; Jonard et al. 2012; Likens et al. 1996; Matzner and Meiwes 1994; Meesenburg et al. 2009; van der Heijden et al. 2011; Vuorenmaa 2004) qui représentent un des piliers de la nutrition des peuplements. Par ailleurs, la baisse des dépôts azotés est moindre et ceux-ci restent bien souvent élevés. Une étude récente de Riofrio-Dillon et al. (2012) a montré à l'aide de la répartition des communautés d'espèces végétales en France une restauration naturelle globale des écosystèmes en France. Cependant, dans un tel contexte, la restauration naturelle des écosystèmes à faible fertilité minérale impactés par ces changements est compromise: soit (1) aucune restauration naturelle n'a pas été observée dans de nombreux écosystèmes (Jandl et al. 2004; Stoddard et al. 1999; Sverdrup et al. 2006; Warby et al. 2007), soit (2) l'acidification et les pertes de cations nutritifs perdurent encore dans certains écosystèmes.

Par exemple, Watmough *et al.* (2005) ont calculé des bilans de flux « entrée-sorties » de nutriments sur 18 bassins-versants au Canada, aux Etats-Unis et en Europe durant les années 1990: pour 14 bassins-versant les bilans indiquaient une perte de Ca allant jusqu'à $31.8 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$ et pour 10 bassins-versant les bilans indiquaient une perte de Mg allant jusqu'à $3.0 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$. Jonard *et al.* (2012) ont montré une acidification du sol dans un peuplement d'épicéa commun sur la période 1993-2009 malgré une très large baisse des dépôts acides. Les

déséquilibres nutritifs entre dépôts azotés excessifs et dépôts alcalino-terreux déficitaires ont engendré une perte de croissance et un drainage accru de nitrate accompagné de calcium et magnésium. Dans un peuplement de sapin pectiné dans les Vosges, malgré une baisse importante des dépôts de sulfate, le flux de drainage en sulfate est resté élevé à cause de la désorption de sulfate du sol (adsorbé lors des épisodes de plus fort dépôts en sulfate). Ce flux ($11.6 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) a généré une perte en cations nutritifs ($1.9 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ de Ca et $0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ de Mg) et une acidification du sol (van der Heijden et al. 2011). Sur la période de 1984 à 2001, en ré-échantillonnant les sols de 145 bassins-versants dans le nord-est des Etats-Unis, Warby *et al.* (2007) ont montré une diminution médiane du taux de saturation de la capacité d'échange cationique de l'horizon O de 23.2% indépendant de la variation du taux de carbone de l'horizon.

Au cours du dernier siècle, les activités humaines ont contribué entre autres à l'élévation de la température moyenne ($+0.7^\circ\text{C}$) et cette augmentation se poursuivra très probablement dans les décennies à venir (IPCC 2007). Une augmentation de la croissance forestière, liée à l'augmentation de la température et au rallongement des saisons de végétation, est attendue dans les forêts où la disponibilité en eau du sol n'est pas un facteur limitant (Boisvenue and Running 2006; Bontemps 2006).

En France et en Europe, les politiques forestières encouragent de plus en plus une intensification des pratiques sylvicoles avec entre autres un raccourcissement des cycles de production et une exportation accrue de biomasse lors des coupes pour réduire la consommation en énergies fossiles (Ericsson 2004; FAO 2010; Mantau et al. 2010; Puech 2009). Cependant, de nombreuses études ont suggéré que l'augmentation de l'exportation de biomasse (exploitation des rémanents) (Aherne et al. 2008; Akelsson et al. 2007) ou l'augmentation de la croissance forestière (Belanger et al. 2004; Huntington 2005) pourraient à terme engendrer des pertes en cations nutritifs échangeables du sol et des réductions de croissance forestière (Holmqvist 2001; van der Heijden et al. 2011; Zaccherio and Finzi 2007). La carte de sensibilité des sols de France aux exportations minérales (Figure I-5) publiée dans Nicolas et al. (2007) montre que les zones les plus sensibles sont aussi les zones les plus boisées (FCBA 2009). Une exportation accrue de la biomasse après coupe dans ces zones sans apports de nutriments (amendement, fertilisation) risquerait sur le long-terme de fortement impacter les pools de nutriments dans le sol et la fertilité minérale de ces écosystèmes.

Les forêts françaises et européennes font face aujourd'hui à des pressions extérieures croissantes. Il est évident que les réponses des écosystèmes face à ces changements seront très variables selon les écosystèmes et selon l'intensité des changements. La durabilité des écosystèmes forestiers à faible fertilité minérale, donc par définition plus sensibles aux perturbations extérieures, est remise en question dans un tel contexte. Les cycles de production étant longs, les politiques forestières et les gestionnaires forestiers ont besoin d'outils permettant de mesurer l'impact des pratiques sylvicoles actuelles et de prédire les réponses des écosystèmes face aux changements globaux (climat et dépôts atmosphériques).

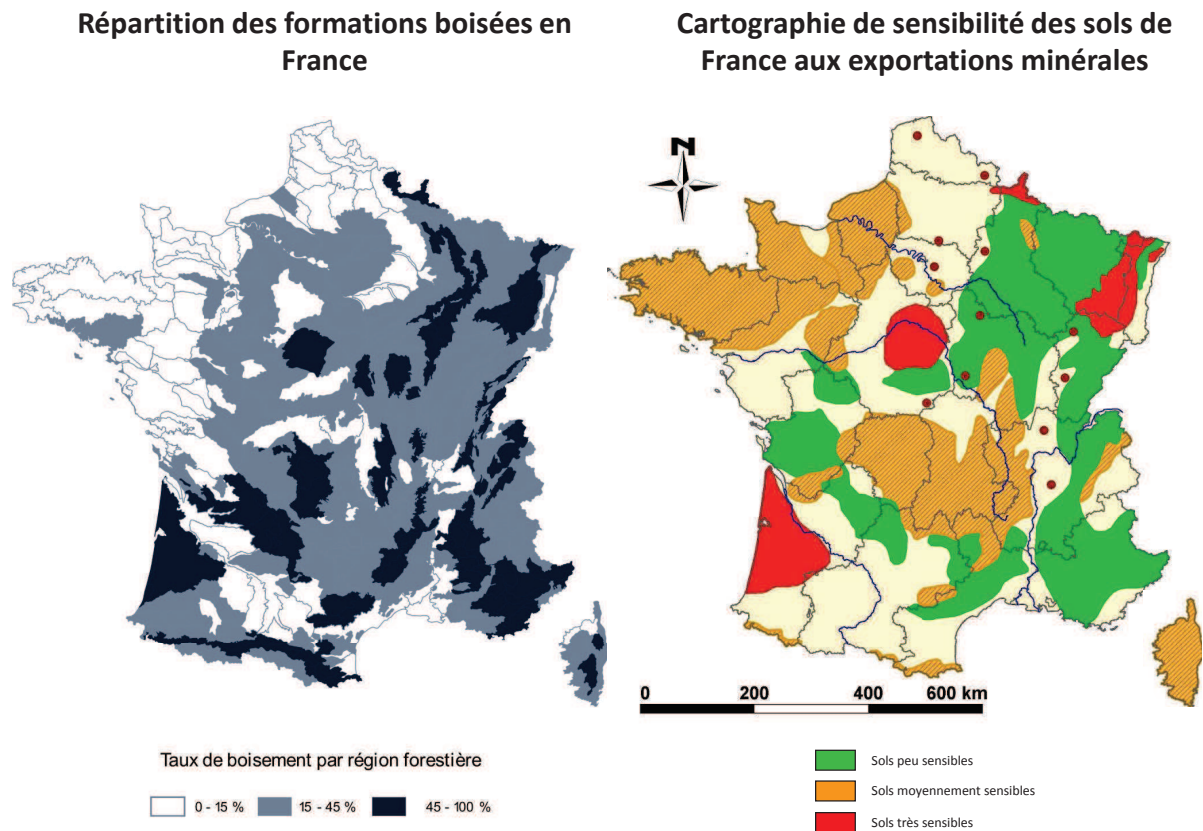


Figure I-5 : Cartes de la répartition des formations boisées en France (FCBA 2009) et de la sensibilité des sols aux exportations minérales. La carte de sensibilité des sols aux exportations minérales (Nicolas et al. 2007) a été réalisée par Alain Brêthes, Jean-Paul Party, Jean-Claude Gégout, Etienne Dambrine et Manuel Nicolas

III. Outils « conventionnels » pour quantifier la pérennité de la fertilité chimique et limites des approches

L'impact des changements climatiques et/ou sylvicoles et/ou de dépôts atmosphériques sur la fertilité chimique des sols forestiers peut être évaluée de trois manières différentes : (i) la comparaison des stocks de nutriments dans le sol à deux dates différentes, (ii) en mesurant des bilans de flux « entrées-sorties » de nutriments et/ou (iii) en modélisant les cycles des éléments minéraux afin de prédire l'évolution des stocks de nutriments.

III.1. Comparaison des stocks de nutriments à deux dates différentes

L'évolution des stocks de nutriments dans le sol peut être directement mesurée en échantillonnant le sol d'une placette à deux dates différentes et en comparant les stocks mesurés aux deux dates. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence des pertes d'éléments nutritifs dans les sols forestiers liées aux dépôts atmosphériques acides et le drainage ou à l'immobilisation de ces nutriments dans les organes aériens des arbres. Bailey *et al.* (2005) ont mis en évidence une large perte en Mg et en Ca entre 1967 et 1997 dans les horizons organiques

et minéraux jusqu'à 100cm de profondeur sur quatre sites forestiers en Pennsylvanie (USA). Bedison et Johnson (2010) ont travaillé sur 54 sites forestiers dans l'Etat de New-York (Etats-Unis) qui avait été échantillonnés en 1930-32 et en 1984 ont été ré-échantillonnés en 2005-2006 (Bedison and Johnson 2010; Johnson et al. 1994; Johnson et al. 2008a). Les auteurs ont mis en évidence une baisse continue sur les 70 ans et une baisse moyenne sur l'ensemble des sites de 64% des stocks de Ca dans le sol entre 1930-1932 et 2005-2006. Dans le bassin-versant Walker-Branch (Tennessee, Etats-Unis), quatre campagnes de prélèvements de sol ont été conduites entre 1972 et 2004 (Johnson et al. 1988; Johnson et al. 2008b; Trettin et al. 1999) : les concentrations en Mg et en Ca échangeable du sol ont diminué de manière constante durant la période d'échantillonnage. Les pertes en Ca ont été principalement attribuées à une forte immobilisation dans la biomasse aérienne tandis que les pertes en Mg ont été attribuées à une perte par drainage (Johnson et al. 2008b). En France, de nombreuses études sont parvenues à des conclusions similaires : Thimonier et al. (2000) ont par exemple mesuré une perte médiane de $18.7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ de Ca et $2.7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ de Mg entre 1970 et 1990 dans les 95 hêtraies du Nord Est. Au col du Donon, sur la période 1986-1996, Bonneau et al. (2006) ont mesuré des pertes de $2.4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ de Ca et $3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ de Mg. D'autres travaux conduisent à des constats similaires (Lefèvre 1997; Poszwa et al. 1998).

Cette approche possède néanmoins des limites. La difficulté majeure réside bien souvent dans la mesure d'une petite différence alors que la variabilité spatiale est forte. Dans ce cas, il est alors très difficile de statuer clairement sur l'évolution des stocks. Par exemple, Hazlett et al. (2011) ont comparé des stocks à partir d'échantillons prélevés en 1986 et en 2003-2005. La différence de stocks entre les deux dates était inférieure à la variabilité spatiale mesurée en 2003-2005. Sur une placette de sapin pectiné dans le massif vosgien, les évolutions de stocks en Mg et Ca du sol étaient aussi inférieures à la variabilité spatiale (van der Heijden et al. 2011). La comparaison de stocks entre deux dates d'échantillonnage est également rendue difficile par la nécessité d'appliquer un protocole identique pour le prélèvement des échantillons et les analyses de sol. Ces protocoles et les techniques analytiques employées évoluent en effet au cours du temps et même si des inter-calibrations sont réalisées, il est difficile de statuer sur la part de variabilité imputable à ces biais. Une étude récente a montré que la mesure de la densité apparente du sol peut varier considérablement en fonction de l'humidité du sol au moment du prélèvement (Goutal 2012). Même si cette méthode de mesure de l'évolution des stocks est la seule méthode directe, elle est aussi une méthode « a posteriori ».

Le suivi de l'évolution de la composition chimique des solutions de sol est également un indicateur de l'évolution des stocks de nutriments disponibles dans le sol. Par exemple, des études ont mis en évidence une relation entre les changements de dépôts atmosphériques et l'évolution de la composition chimique des solutions de sol (Alewell et al. 2000; Verstraeten et al. 2012).

III.2. Calcul de bilans de flux « entrées-sorties »

L'évolution des stocks de nutriments dans le sol sur une période donnée peut être indirectement estimée en calculant des bilans de flux « entrée-sorties » pour chaque nutriment (Ranger and Turpault 1999). Les variations de stocks en nutriments dans l'écosystème sont évaluées en mesurant les entrées et les sorties de nutriments de cet écosystème en appliquant le principe de conservation de la masse. Généralement, l'approche par les bilans de flux « entrées-

sorties » est appliquée aux stocks échangeables du sol (stocks disponibles au prélèvement par les plantes). Les entrées à l'écosystème comprennent les dépôts atmosphériques totaux **AD** (dépôts humides, secs et occultes), le flux d'altération des minéraux du sol **W**, la fixation symbiotique et non-symbiotique d'azote, les entrées latérales (drainage latérale et colluvionnement), les remontées capillaires, les entrées biologiques (faune et flore) et les apports anthropogéniques (fertilisation, amendements...). Les sorties comprennent, l'immobilisation de nutriments dans la biomasse aérienne **U**, les pertes par drainage en bas de profil **L**, les pertes latérales (drainage latérale et colluvionnement), les pertes d'azote par dénitrification et volatilisation et les pertes biologiques (faune et flore). Les entrées et les sorties peuvent être simplifiées. Ainsi, la variation des stocks bio-disponibles **ΔBS** (somme des nutriments du pool échangeable du sol et de l'humus) peut s'écrire :

$$\Delta BS = inputs[AD + W] - outputs[U + L]$$

Les bilans de flux « entrées-sorties » sont très communément utilisés pour étudier la durabilité de la fertilité chimique du sol face aux différents changements climatiques et/ou sylvicoles et/ou de dépôts atmosphériques (Ranger and Turpault 1999). Cet outil a été utilisé dès les débuts de la recherche moderne sur les écosystèmes pour identifier les tendances d'évolution de la fertilité du sol (Binkley and Richter 1987; Bormann and Likens 1967; Boyle et al. 1973; Likens et al. 1977; Norton and Young 1976; Swank and Douglass 1977). Des bilans de flux « entrées-sorties » ont été utilisés à plusieurs échelles allant de la placette forestière au bassin versant (Henderson et al. 1978; Hornbeck et al. 1997; Lowrance et al. 1983; Watmough and Dillon 2003), dans des écosystèmes tempérées (Bonneau et al. 1991; Brumme et al. 2009; Dambrine et al. 2000; Johnson and Todd 1998; van der Heijden et al. 2011), boréaux (Akelsson et al. 2007; Sverdrup and Rosen 1998; Sverdrup et al. 2006; Timmer et al. 1983) et tropicaux (Bruijnzeel 1991; Laclau et al. 2005; Lesack and Melack 1996). Ces bilans permettent d'étudier les dynamiques d'accumulation ou de pertes en nutriments sur une période donnée mais ne permettent pas de quantifier l'évolution de la fertilité du sol sur l'ensemble de la vie d'un peuplement. L'utilisation de chronoséquences de peuplements (peuplements de même type sur le même type de sol à différents âges ou stade de développement) permet d'extrapoler les bilans de flux « entrées-sorties » sur l'ensemble de la vie d'un peuplement. Ceci a été réalisé en France pour une chronoséquence de sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Franco) (Ranger et al. 2002), pour une chronoséquence de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) (Legout 2008) et une chronoséquence d'épicéa commun (*Picea abies* Karst.) (Fichter 1997; Fichter et al. 1998). Ces études utilisant des chronoséquences de peuplement permettent d'étudier indirectement la réponse des écosystèmes aux changements probables du futur.

III.3. La modélisation des cycles biogéochimiques du Mg et du Ca

De très nombreux modèles numériques de simulation des cycles biogéochimiques ont été développés pour étudier les cycles des nutriments et prédire l'évolution future des écosystèmes : ForSAFE (Altaveg 1998; Wallman et al. 2005; Warfvinge and Sverdrup 1992), NuCM (Johnson et al. 2000; Johnson et al. 1993; Kvindesland 1997; Liu et al. 1991; Munson et al. 1992), MAGIC (Cosby et al. 2001; Cosby et al. 1985a; Cosby et al. 1985b), SMART (Vries et al. 1989). Ces modèles conceptualisent et résument les connaissances sur les processus et les sources de nutrition. Malgré la grande diversité de modèles (modélisation de différentes échelles, différents pas de temps ou différents processus), ces modèles ont une structure

commune. L'écosystème est divisé en réservoirs de nutriments qui représente chacun un compartiment de l'écosystème : horizon de sol, phase échangeable du sol, solution du sol, phase minérale, matière organique, plante... Ces différents réservoirs sont interconnectés et les échanges entre réservoirs sont régis par une série d'équations. Des données « entrées » (dépôts atmosphériques, climat...) sont implémentées et le modèle simule des données « sorties » (composition chimique des solutions de sol et de la phase échangeable du sol, croissance forestière...). Ces modèles ont été notamment utilisés pour calculer les charges critiques acides (Belyazid et al. 2011; de Vries and Kros 1991; de Vries et al. 1995; Sverdrup et al. 1992; Warfvinge and Sverdrup 1992), simuler l'effet des dépôts atmosphériques (Forsius et al. 1998; Johnson et al. 1993; Langan et al. 2009; van der Heijden et al. 2011; Warfvinge et al. 1998) ou simuler les effets des pratiques sylvicoles (Merganičová et al. 2005; van der Heijden et al. 2011) sur l'évolution de la fertilité chimique du sol.

III.4. Limites des approches bilans de de flux « entrées-sorties » et modélisation

Les bilans de flux « entrées-sorties » et les modèles numériques de simulation des cycles biogéochimiques ont été souvent utilisés pour prédire l'évolution de la fertilité du sol. Cependant, les résultats des bilans de flux « entrées-sorties » ou de la modélisation n'ont que rarement été validés par des mesures d'évolutions des stocks dans les sols. Dans un bassin-versant des Adirondack Mountains (New-York, Etats-Unis), Johnson *et al.* (2008a) ont mesuré une diminution des pools échangeables de Ca (entre 7.6 et 9.8 kg.ha⁻¹.an⁻¹) dans l'horizon organique entre 1984 et 2004 qui était en accord avec le bilan de flux « entrées-sorties » de calcium sur ce bassin-versant (- 8.4 kg.ha⁻¹.an⁻¹). Dans des peuplements d'épicéa commun âgés de 40 et 90 ans dans les Vosges, les bilans de flux « entrées-sorties » de Ca, Mg et K ont été comparés aux pertes en Ca, Mg et K estimées par deux prélèvements de sol en 1990-91 et 1996 (Dambrine et al. 1998b). Les pertes en Ca étaient en accord avec les bilans même si les bilans surestimaient légèrement la perte en Ca dans le jeune peuplement (40 ans). En revanche, dans cette même étude les pertes en Mg et en K étaient largement sous-estimées par les bilans. De nombreuses études ont aussi trouvé une disparité entre l'évolution prédite par des bilans de flux « entrées-sorties » et celle mesurée par échantillonnage du sol à deux dates différentes. Dans une étude récente portant sur le massif des Vosges, aucune diminution des stocks échangeables de Mg et Ca du sol (0-70cm) n'a été observée sur une période de 13 ans alors que les bilans de flux « entrées-sorties » étaient négatifs pour les deux éléments et sur l'ensemble de la période (en moyenne -1.9 kg.ha⁻¹.an⁻¹ de Ca et -0.8 kg.ha⁻¹.an⁻¹ de Mg) (van der Heijden et al. 2011). Hazlett *et al.* (2011) n'ont observé aucune évolution des stocks échangeables de Mg et Ca sur une période de 17 à 19 ans dans les sols du bassin-versant de Turkey Lakes (Canada) alors que les bilans de flux « entrées-sorties » indiquaient une perte de -0.5 kg.ha⁻¹.an⁻¹ de Mg et -32 kg.ha⁻¹.an⁻¹ de Ca. Johnson *et al.* (1982) ont calculé des bilans de flux « entrées-sorties » dans un peuplement de chêne pour étudier l'impact de l'exportation des rémanents lors des coupes forestières. Ces bilans furent contredits par le ré-échantillonnage des sols 15 ans après la coupe : les stocks échangeables de Ca étaient restés constant alors que les bilans indiquent une perte de Ca (Johnson and Todd 1998). La confrontation des résultats des bilans de flux « entrées-sorties » aux mesures d'évolution des stocks dans les sols met en évidence des incohérences. De manière générale, les bilans de flux « entrées-sorties » ont tendance à surestimer les pertes de nutriments.

Les incohérences entre les résultats de calculs de bilans de flux « entrées-sorties » et de mesure d'évolution des stocks entre deux dates peuvent être liées à la difficulté de mettre en évidence une évolution des stocks du sol par ré-échantillonnage, comme discuté précédemment (§ III.1). Ces incohérences peuvent aussi être liées à des erreurs dans le calcul des flux et/ou bilans. Nous pouvons ainsi pour chaque terme du bilan tenter d'évaluer les incertitudes liées à la méthode classiquement utilisée pour calculer les flux.

III.4.1. Immobilisation dans la biomasse

Si estimer les stocks de nutriments immobilisés dans la biomasse aérienne ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) à une date donnée est assez simple à partir de tarifs de minéralomasse. Des simulations de Monte-Carlo peuvent être appliquées pour estimer l'incertitude autour des stocks de nutriments immobilisés. Yanai *et al.* (2010) ont par exemple trouvé une incertitude de 8% autour de l'azote immobilisé dans la biomasse aérienne dans des peuplements du bassin-versant du Hubbard Brook aux Etats-Unis. Sicard *et al.* (2006) ont quant à eux calculé des incertitudes autour des estimations d'immobilisation pour deux essences (épicéa commun et sapin de douglas) de N (11% et 3% respectivement), P (9% et 7%), K (7% et 7%), Ca (7% et 9%) et Mg (22% et 6%). Il est cependant plus difficile d'estimer l'incertitude autour de l'immobilisation courante de nutriments ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). L'immobilisation courante est communément estimée en appliquant les tarifs de minéralomasse aux données d'inventaires forestiers à plusieurs dates différentes. Cette approche repose sur l'hypothèse que les concentrations en nutriment dans les différents organes de l'arbre restent constantes au cours du temps et que les tarifs appliqués restent valides sur la période d'étude. L'incertitude est également très difficile à estimer pour les autres termes du bilan de flux « entrées-sorties ». En effet, ceux-ci sont estimés avec des méthodes indirectes avec des modèles plus ou moins complexes.

III.4.2. Dépôts atmosphériques

L'interaction des nutriments avec la canopée rend l'estimation des dépôts secs difficile. La méthodologie communément acceptée (Ulrich 1983) repose sur de nombreuses hypothèses qui n'ont jamais été vérifiées ou qui le sont difficilement. Par exemple, l'utilisation du sodium pour calculer les dépôts secs de Ca et de Mg a été remise en cause par une étude de Reiners and Olson (1984) qui ont montré une absorption foliaire de sodium. L'utilisation de capteurs inertes montre que l'utilisation du Na pour calculer la part du Mg déposée sous forme d'aérosols solubles est raisonnable, mais qu'elle est plus problématique pour le Ca, dont l'origine est assez différente (Dambrine *et al.* 1998a). Cette problématique a été discutée par Staelens *et al.* (Staelens *et al.* 2008). Dans une synthèse récente, Lequy *et al.* (2012) estime le dépôt particulaire sec de Ca et Mg à 30% des intrants (dépôts atmosphériques et altération minérale) dans les écosystèmes à faible fertilité minérale. Cette entrée n'est actuellement pas prise en compte dans le calcul des flux de dépôts atmosphériques.

III.4.3. Altération des minéraux du sol

La difficulté d'estimer le flux d'altération a été résumé par Klaminder *et al.* (2011). Les auteurs ont estimé le flux d'altération de Ca et K avec sept méthodes différentes : l'incertitude générée par les résultats des différentes méthodes était de 106% pour Ca et 97% pour K. Le modèle PROFILE (Sverdrup and Warfvinge 1988) a été très largement utilisé pour estimer le flux

d'altération minérale dans les écosystèmes forestiers. En faisant varier les paramètres du modèle dans un intervalle de valeurs mesurées sur des sites expérimentaux, Hodson *et al.* (1996) ont montré que les résultats du modèle PROFILE sont très sensibles aux données d'entrées du modèle (variations de plus 100% des valeurs de flux).

La biosphère peut avoir une forte influence sur les processus d'altération des minéraux du sol. Turpault *et al.* (2009) ont par exemple mis en évidence l'influence de la rhizosphère en incubant des minéraux tests dans un sol forestier acide que l'altération des minéraux était de 3 à 4 fois plus importante dans la rhizosphère. Il a aussi été montré que les micro-organismes ont la capacité d'altérer les minéraux du sol (Arocena *et al.* 2011; Calvaruso *et al.* 2006; Jongmans *et al.* 1997). La composante biologique n'est pour l'instant pas prise en compte dans les modèles d'estimation des flux d'altération minérale. Il est en effet difficile de (1) quantifier l'effet de la biosphère sur l'altération minérale et (2) quantifier la proportion de sol rhizosphérique dans le sol total. Le flux d'altération minérale « utile » à la nutrition des plantes pourrait être largement sous-estimé.

III.4.4. Pertes par drainage profond

Le drainage en nutriments à la base des profils est virtuellement impossible à mesurer directement dans les sols forestiers (Bormann and Likens 1967). Ce flux est communément estimé en couplant le flux d'eau en bas de profil calculé à l'aide de modèles hydriques avec les concentrations mesurées dans la solution de sol. Il existe de nombreux modèles hydriques disponibles (Granier *et al.* 1999; Kohne *et al.* 2009; Simunek *et al.* 2003; Starr 1999) qui couvrent une large gamme de complexité : profil du sol plus ou moins discrétisé, modèles de type à réservoirs et à flux ou modèles mécanistiques basés sur la résolution des équations d'écoulement de l'eau en milieu non-saturé (équations de Richards). La perte par drainage de nutriment est très sensible à l'estimation du flux de drainage d'eau. La modélisation des flux d'eau dans les écosystèmes forestiers est donc essentielle pour calculer les bilans de flux « entrées-sorties » (Ranger and Turpault 1999). Pour prédire le flux de drainage d'eau, les modèles hydriques sont communément calibrés et validés sur des jeux de données d'humidité volumique du sol ou de potentiel hydrique du sol (TDR, tensiomètres ou prélèvement de sol). Cependant, peu d'études d'hydrologie forestière ont validé ces calibrations avec des expériences de traçage de l'eau.

La deuxième problématique est le couplage de ce flux d'eau aux concentrations de la solution du sol. Il existe en effet plusieurs type d'eau dans le sol (schématiquement eau gravitaire, eau faiblement lié et eau fortement lié) qui ont des temps de résidence variables et par conséquent des compositions chimiques différentes (Legout *et al.* 2009; Marques *et al.* 1996; Ranger *et al.* 1993; Ranger *et al.* 2001). Les calculs de drainage sont réalisés à partir de la chimie des solutions de sol collectées par des plaques lysimétriques (eaux gravitaires) (Ranger *et al.* 1993), par des bougies poreuses (eaux gravitaire et eaux faiblement liées) (van der Heijden *et al.* 2011), ou par les deux (Legout 2008). Ces différentes méthodes pour calculer le drainage de nutriments n'ont cependant pas été validées. La séparation des flux matriciel (flux lent dans la microporosité) et préférentiel (flux rapide dans la macroporosité du sol) d'eau n'a pas, à notre connaissance, été prise en compte dans les calculs de pertes de nutriments par drainage. Cependant, Brooks *et al.* (2010) ont suggéré des contributions différentes de ces deux types d'écoulements au débit du ruisseau.

Une méthode récente utilisant des capsules de surface connue de résine d'échange cationique ou anionique a été développée et est une alternative pour mesurer les flux de drainage de nutriments (Susfalk and Johnson 2002). Les capsules de résine sont insérées horizontalement dans le sol. Les anions ou les cations transitant à travers le sachet de résine sont retenus par celle-ci. Après une période de temps donnée, les sachets de résines sont retirés du sol et les anions ou cations sont extraits au laboratoire par échange ionique.

Une source potentielle d'erreur dans l'estimation des pertes par drainage est la profondeur au-delà de laquelle tout drainage de nutriments est considéré comme une perte à l'écosystème. Si le système racinaire descend dans les horizons profonds, il est possible que des nutriments soient prélevés dans ces horizons.

III.4.5. Estimation de l'incertitude autour des différents termes du bilan de flux « entrées-sorties »

L'incertitude autour des différents termes des bilans de flux « entrées-sorties » et donc l'incertitude autour des évolutions prédites des stocks de nutriments du sol est difficile à estimer. Bien que des méthodes aient été proposées pour estimer l'incertitude autour de l'estimation des pools de nutriments stockés dans la biomasse aérienne (Sicard et al. 2006; Yanai et al. 2010), l'incertitude autour des autres termes des bilans (flux de drainage, altération et dépôts atmosphériques) n'a pas été estimée. La connaissance de l'incertitude permettrait de mieux interpréter les évolutions prédites surtout lorsque les bilans de flux « entrées-sorties » sont proches de l'équilibre.

III.4.6. Limites des connaissances sur la relation sol-plante

Les limites des approches « conventionnelles » sont liées (1) aux limites des méthodes/protocoles d'analyses/estimation des différents flux et aussi (2) aux limites des connaissances sur les cycles biogéochimiques et en particulier la relation sol-plante.

De nombreuses études ont aussi montré des incohérences ou incompréhensions dans la nutrition des arbres illustrant notre compréhension incomplète de la relation entre le sol et la plante. Par exemple, aucun signe de dépérissement forestier n'a été observé dans un peuplement de sapin pectiné des Vosges alors que les concentrations foliaires (utilisées comme indicateurs de la nutrition) en Mg étaient en dessous du seuil de carence défini par Bonneau (1995). Sur ce même site, les concentrations foliaires en Ca étaient au-dessus des teneurs optimales alors que les stocks de Ca échangeable du sol étaient très faibles (van der Heijden et al. 2011). Des résultats similaires ont été observés dans les forêts d'Ontario (Canada) : l'acidification des sols et les pertes en Ca échangeables n'ont pas été reflétées dans l'évolution des concentrations foliaires en Ca (Miller and Watmough 2009). Les évolutions de concentrations foliaires en Ca n'ont pas pu être reliées à l'évolution de la composition chimique de la solution du sol dans des pessières d'Autriche et d'Allemagne (Jandl et al. 2004) mais étaient corrélées à la pluviométrie durant la saison de végétation dans des hêtraies et des chênaies de France et de Belgique (Jonard et al. 2009).

IV. Utilisation de l'outil isotopique

Les isotopes d'un élément donné contiennent un nombre identique de protons (Z) et d'électrons, mais un nombre de neutrons (N) différent. Ils ont des propriétés chimiques similaires car ils possèdent la même configuration électronique et le même rayon ionique. Par contre, leurs propriétés physico-chimiques peuvent différer à cause de leur différence de masse. Les isotopes sont soit stables, soit radioactifs. On parle d'isotopes radioactifs quand les noyaux des atomes se transforment en d'autres noyaux, et émettent des particules ou des rayonnements, à la différence des isotopes stables dont le temps de demi-vie est supérieur à 10^6 ans. Le développement de la géochimie des isotopes stables est lié à celui de la spectrométrie de masse, et les avancées récentes dans ce domaine ont permis d'élargir le champ d'investigation à plusieurs éléments dits non-conventionnels tel que le magnésium et le calcium.

Le calcium présente six isotopes stables dont l'abondance moyenne dans la nature est: ^{40}Ca (96,94%), ^{42}Ca (0,647%), ^{43}Ca (0.135%), ^{44}Ca (2.08%), ^{46}Ca (0.004%) et ^{48}Ca (0.187%). Le magnésium présente trois isotopes stables dont l'abondance moyenne dans la nature est : ^{24}Mg (78,99%), ^{25}Mg (10,00%) et ^{26}Mg (11,01%) (Hoefs 2009). Les différences des propriétés physico-chimiques des isotopes d'un élément induisent des fractionnements isotopiques, c'est-à-dire un changement de la composition isotopique d'un composé au cours de certains processus.

IV.1 Isotopie naturelle

Les premières études de variations isotopiques naturelles du calcium et du magnésium ont permis de faire un état de l'art des différentes compositions isotopiques de différents réservoirs tels que les roches et les eaux (Brenot et al. 2008; de Villiers et al. 2005; Halicz et al. 1999; Pogge von Strandmann et al. 2008; Russell et al. 1978; Schmitt 2003; Schmitt et al. 2003; Skulan et al. 1997; Teng et al. 2007; Tipper et al. 2006a; Young and Galy 2004; Zhu and Macdougall 1998), la flore (Black et al. 2008; Black et al. 2006; Bolou-Bi et al. 2010; Cobert et al. 2011) et la faune (Russell et al. 1978; Skulan et al. 1997). Malgré la très faible variation de la composition isotopique à l'échelle planétaire pour ces deux éléments ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ de -4.5‰ à +1‰ et $\delta^{44}\text{Ca}_{\text{NIST 915a}}$ de -4‰ à 0‰), l'outil isotopique a permis de mettre en évidence plusieurs processus tel que des relations trophiques (Zhu and Macdougall 1998) et le transport de magnésium du bassin-versant jusqu'au océan (Brenot et al. 2008; de Villiers et al. 2005; Tipper et al. 2008a).

L'application de ces techniques isotopiques aux cycles du calcium et magnésium dans les écosystèmes forestiers est en développement mais semble très prometteur. Les plantes ont une forte influence sur la composition isotopique du Mg dans les écosystèmes. Un gradient de fractionnement isotopique a été mis en évidence depuis les racines jusqu'aux feuilles/aiguilles (Black et al. 2008; Bolou-Bi et al. 2010; Bolou-Bi et al. 2012). Dans les Vosges, Bolou Bi (2009) a mis en évidence des rapports isotopique du Mg différents selon l'âge des aiguilles d'épicéa. Il en a déduit un processus de fractionnement isotopique du Mg lors de la translocation du Mg (translocation probablement sous forme complexée). Dans ce même bassin-versant, les rapports isotopiques du magnésium a permis de déterminer les sources dans le bassin-versant contribuant au débit du ruisseau selon le régime hydrique (Bolou-Bi et al. 2012). Un fractionnement isotopique se produit aussi lors du prélèvement de Ca par les plantes (Cenki-Tok

et al. 2009; Cobert et al. 2011; Hindshaw et al. 2012; Holmden and Bélanger 2010; Page et al. 2008; Wiegand et al. 2005). Le résultat de ce fractionnement biologique est un gradient de rapports isotopiques dans le sol (Holmden and Bélanger 2010; Page et al. 2008) et une différence de signature isotopique entre le Ca des pools organique du sol (litière au sol) et le pool minéral de Ca, ce qui permet de tracer les sources de Ca dans l'écosystème. Holmden and Bélanger (2010) en utilisant un simple modèle de mélange isotopique ont pu calculer la contribution de l'altération au cycle du Ca mais la précision de calcul de ce flux était limitée par les faibles différences de signatures isotopiques entre les différentes sources ($\sim 1\text{‰}$). Farkaš *et al.* (2011) en calculant un excès de ^{40}Ca lié à la dégradation radiogénique de ^{40}K a évalué la contribution relative de l'altération au pool échangeable de Ca du sol. Les résultats de cette étude suggèrent aussi l'importance de la part biologique dans le cycle du Ca.

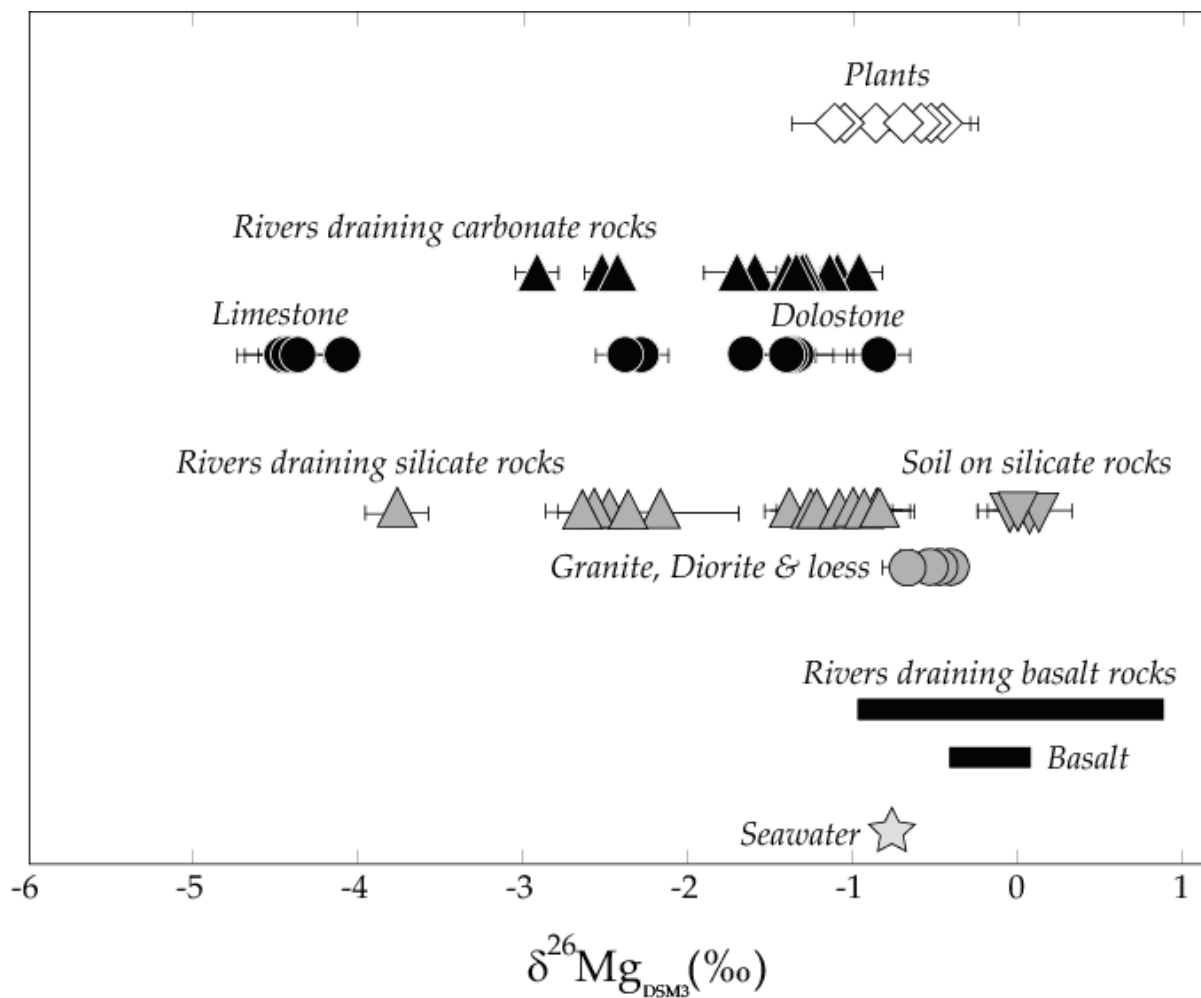


Figure 1-6 : Comparaison des variations isotopiques naturelles mesurées dans différents matériaux et réservoirs de magnésium (Bolou-Bi *et al.* 2009; Brenot *et al.* 2008; de Villiers *et al.* 2005; Pogge von Strandmann *et al.* 2008; Teng *et al.* 2007; Tipper *et al.* 2006a; 2008a; Tipper *et al.* 2006b; Wiechert and Halliday 2007; Young and Galy 2004). Extrait de Bolou Bi (2009)

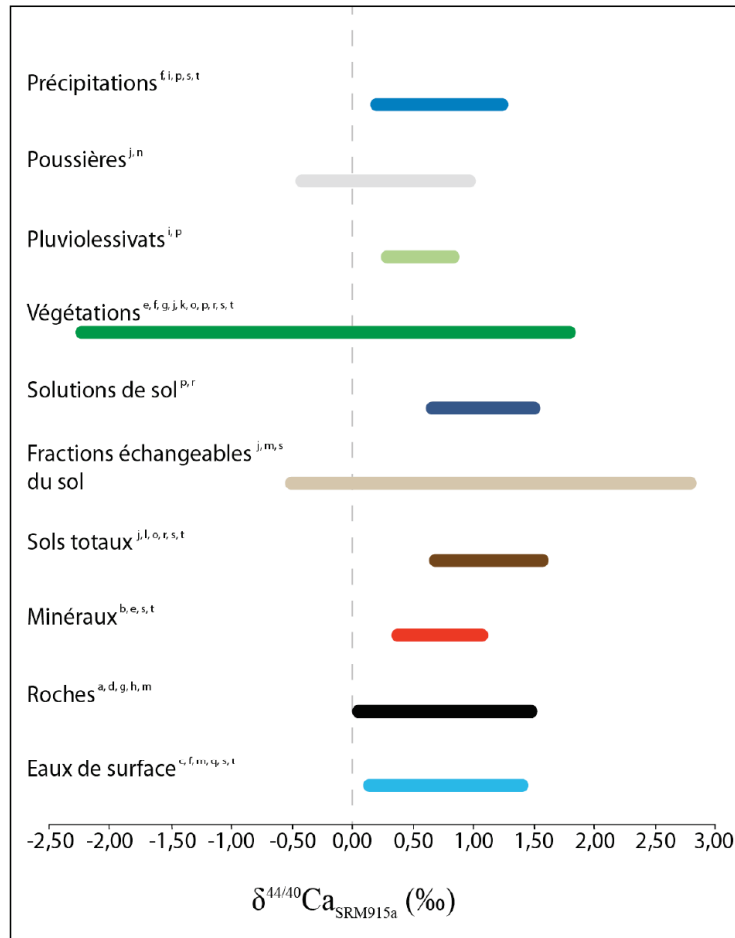


Figure I-7 : Synthèse des variations isotopiques naturelles du calcium ($\delta^{44}\text{Ca}$) dans les différents réservoirs sur les continents (Amini et al. 2009; Bullen and Bailey 2005; Cenki-Tok et al. 2009; Chu et al. 2006; DePaolo 2004; Ewing et al. 2008; Farkaš et al. 2011; Hindshaw et al. 2011; Holmden and Bélanger 2010; Marshall and Depaolo 1982; Page et al. 2008; Perakis et al. 2006; Schmitt et al. 2003; Schmitt and Stille 2005; Skulan and DePaolo 1999; Tipper et al. 2006a; Wiegand et al. 2005; Zhu and Macdougall 1998). Extrait de Cobert (2012).

Pour résumer, étudier les variations isotopiques naturelles du calcium et du magnésium permet de mieux comprendre le cycle de ces éléments dans les écosystèmes forestiers, de tracer des processus dans les plantes et dans le sol et permet dans certains cas de tracer les sources de Mg et de Ca. Cependant, les variations isotopiques naturelles du calcium et du magnésium sont très faibles dans les écosystèmes rendant ainsi difficile le traçage des sources (altération, prélèvement de la plante). Aux différentes signatures isotopiques des sources s'ajoutent les processus de fractionnement isotopiques qui complexifient les modèles de mélange.

IV.2. Enrichissement, traçage et dilution isotopique

IV.2.1. Principe des techniques de marquage, traçage et dilution isotopique

Les techniques de marquage et de traçage isotopique ont été utilisées depuis de nombreuses années et dans de nombreux domaines. En sciences environnementales, des techniques de traçage en ^{13}C (Epron et al. 2012; Hobbie and Werner 2004; Kammer and Hagedorn 2011), ^{15}N (Dawson et al. 2002; Zeller 1998; Zeller et al. 1998; 2000; 2001), ^{18}O (Koeniger et al. 2010; Zapater et al. 2011) ou ^2H (Becker and Coplen 2001; Koeniger et al. 2010; Marc and Robinson 2004) ont souvent été mises en œuvres.

L'incorporation d'un traceur isotopique à un compartiment de l'écosystème permet, moyennant une mesure précise de la concentration de ce traceur dans les différents compartiments au cours du temps et la connaissance des flux d'entrées et de sorties, de calculer le stock de l'élément tracé dans le pool de départ, le flux de passage de l'élément tracé du compartiment de départ aux autres compartiments et enfin le flux d'entrée de l'élément tracé dans le compartiment de départ.

Les expériences de traçage isotopique du calcium et du magnésium utilisant des isotopes stables sont plus rares parce que ces éléments ne sont pas de première importance sur le plan agronomique ou physiologique, parce que le matériel enrichi pour ces éléments est très onéreux et enfin parce que les techniques analytiques pour ces isotopes n'ont été développées que récemment. En conséquence, les études ayant eu recours aux techniques de marquage n'ont tracé le calcium et le magnésium qu'à des échelles fines ou dans des expériences *ex situ*.

IV.2.2. Traçage du prélèvement racinaire et de la translocation

Quelques expériences de traçage ont été réalisées à des échelles fines pour étudier les dynamiques de prélèvement racinaire de Mg et de Ca (Gottlein et al. 2005; Kuhn et al. 1995), le rôle des champignons mycorhiziens dans le prélèvement de Mg et Ca (Bucking et al. 2002; Jentschke et al. 2000; Jentschke et al. 2001; Kuhn et al. 2000) et le transport dans le xylème (Kuhn et al. 1997; Metzner et al. 2010). Becker *et al.* (2008) ont étudié l'effet de la température sur le prélèvement de Mg et de Ca chez l'orge. Les plants d'orge avaient été cultivés dans une solution hydroponique enrichie en ^{25}Mg et ^{44}Ca à différentes température (10°C et 20°C).

IV.2.3. Traçage du recyclage interne à la plante

Quelques expériences de marquage de jeunes plants en pot ont été conduites pour étudier le prélèvement et le recyclage de nutriments interne à la plante: marquage de pin sylvestre (Midwood et al. 2000; Proe et al. 2000), marquage d'épicéa de Sitka (Weatherall et al. 2006c). Ces expériences ont montré l'importance de la translocation interne à la plante pour la croissance de nouveaux organes. Chez le pin sylvestre, près de 80% et 50% du K et du Mg respectivement dans les nouveaux organes était issu de la translocation interne (Proe et al. 2000). Chez l'épicéa de Sitka, de 30% à 50% du Mg dans les nouveaux organes était issu de la translocation interne (Weatherall et al. 2006c). Les deux études ont montré que la part de translocation interne dans la croissance de nouveaux organes était indépendante de la

disponibilité en Mg dans le sol. Des expériences de marquage de jeunes plants d'épicéa de Sitka en pot ont aussi permis de mesurer la contribution de la dégradation de rémanents à la nutrition en Mg, Ca et K (Weatherall et al. 2006a). Pour le Mg, de 3% à 20% du traceur dans les rémanents a été prélevé durant la première année, de 2% à 8% pour le K et de 8% à 34% pour le Ca.

IV.2.4. Traçage isotopique à l'échelle de l'arbre

Une expérience de traçage multi-isotopique a également été conduite par Augusto et al. (2011) en injectant dans le tronc de pins maritimes (*Pinus pinaster* (Ait)) une solution enrichie en ^{15}N , ^{26}Mg et ^{42}Ca . L'objectif initial de cette étude était de marquer uniformément les aiguilles afin de mesurer plus précisément les échanges foliaires avec la pluie. Cependant, le transport des traceurs ^{26}Mg et ^{42}Ca dans le xylème était très lent et les aiguilles n'ont été marquées que deux ans après l'injection. Cette étude a néanmoins permis de mettre en évidence les processus de transport des cations dans le xylème.

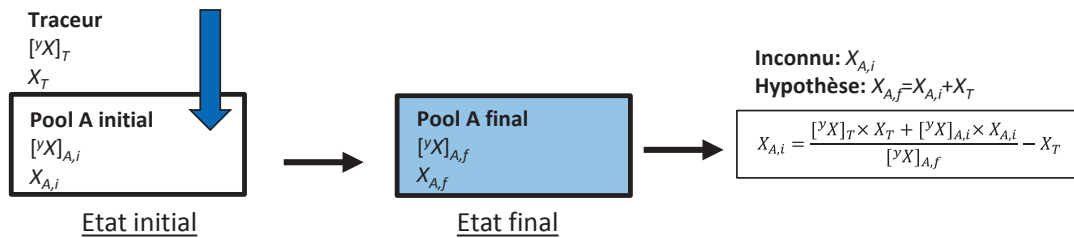
Les isotopes stables du magnésium et du calcium sont donc des outils à très fort potentiel pour tracer des processus et tracer des sources dans les écosystèmes forestiers. Les variations isotopiques naturelles sont souvent trop faibles pour pouvoir tracer des sources mais sont d'excellents traceurs de processus. Les deux approches (variations isotopiques naturelles et traçage isotopique) sont complémentaires. En effet, l'utilisation de traceurs isotopiques (matériel enrichi) permet de modifier la signature isotopique d'un compartiment dans l'écosystème ($\delta^{26}\text{Mg}$ ou $\delta^{44}\text{Ca}$ d'un facteur allant de 100‰ à 10000‰) et ainsi de tracer les flux entrant et sortant de ce compartiment ce qui permet de tester des hypothèses. Cependant, jusqu'à ce jour, les techniques de traçage isotopiques utilisant les isotopes stables du Mg et du Ca n'avaient jamais été appliquées *in situ* à l'échelle de l'écosystème entier.

IV.3. Mesures des compositions isotopiques du magnésium et du calcium

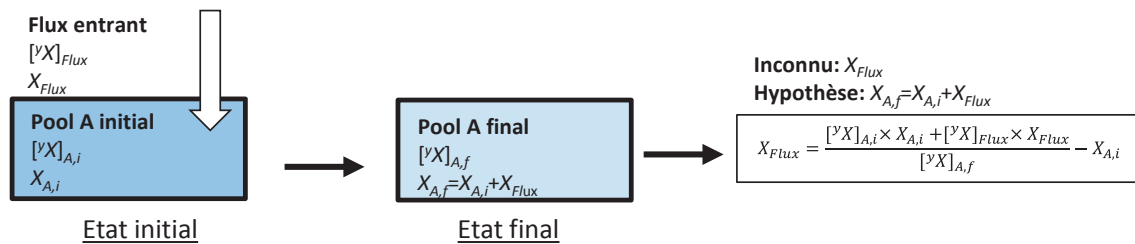
Les rapports isotopiques du Mg et du Ca peuvent être analysés avec différents types de spectromètre de masse : spectrométrie de masse à ionisation thermique (TIMS), spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif et à multi-collection (MC-ICP-MS), spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS). Bien que ces spectromètres de masse soient différents, leur fonctionnement repose sur les mêmes principes. Les différents composés chimiques qui composent l'échantillon sont atomisés puis ionisés (formation d'ions avec une charge positive), un faisceau ionique est généré en accélérant et en focalisant les ions, ces ions sont ensuite séparés par un champ magnétique selon leur masse et leur charge (m/z). Enfin le faisceau ionique ainsi séparé ou filtré percute un détecteur qui comptabilise les ions de ce faisceau (coup/sec). Les différents types d'instruments se différencient par le procédé d'ionisation, par la méthode de séparation des ions dans le faisceau ionique et par le type de détecteur. Les rapports isotopiques du Mg et Ca sont classiquement analysés avec des spectromètres de masse de type MC-ICP-MS (Bolou-Bi et al. 2010; Bolou-Bi et al. 2012; Halicz et al. 1999; Meija et al. 2009; Morgan et al. 2011; Tipper et al. 2008b) ou TIMS (De La Rocha and DePaolo 2000; DePaolo 2004; Ewing et al. 2008; Gopalan et al. 2006; Heuser et al. 2002; Holmden 2005; Russell et al. 1978; Skulan et al. 1997; Zhu and Macdougall 1998). Ces instruments diffèrent par le procédé d'ionisation. Dans le système TIMS, l'échantillon est déposé

sur un filament (e.g. Re, Ta, W) qui est chauffé par un courant électrique à travers ce filament et engendre l'ionisation de l'échantillon. Dans le système MC-ICP-MS, l'échantillon (liquide) est injecté dans un plasma d'argon (ICP). Le système de séparation et les cages de faraday (détecteurs système multi-collection) de ces instruments permettent de mesurer simultanément plusieurs masses différentes. TIMS et MC-ICP-MS sont les spectromètres de masse les plus précis et ont la plus haute résolution (capacité à distinguer deux masses différentes) pour analyser les rapports isotopiques du magnésium et du calcium mais requièrent tous deux une étape préalable à l'analyse de purification chimique de l'échantillon de manière à éliminer les interférences spectrales (décrites ci-dessous).

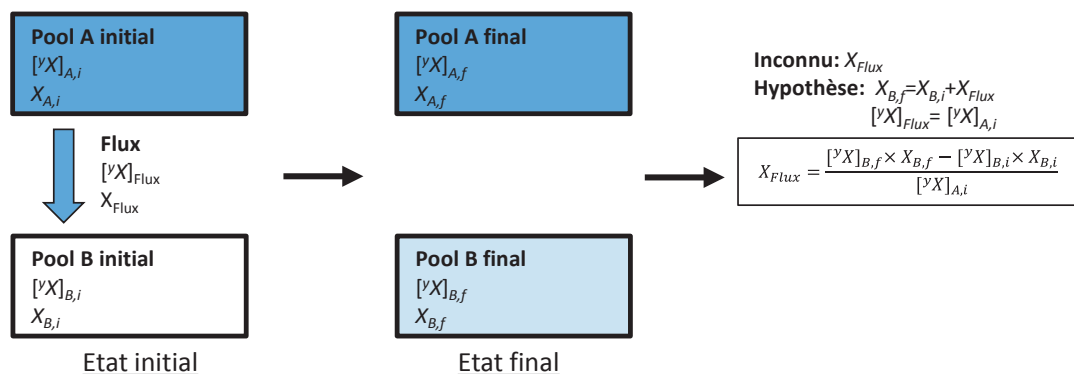
A. Mesure de la taille d'un pool par marquage isotopique



B. Mesure d'un flux entrant dans un pool marqué



C. Mesure d'un flux entre deux pools



X_A est la quantité de l'élément total X dans le pool ou le flux « A »
 $[^yX]_A$ est la concentration du traceur isotopique yX de l'élément X dans le pool ou le flux « A »

Figure I- 8: Théorie de la dilution isotopique

Les systèmes ICP-MS permettent aussi de mesurer les rapports isotopiques du Mg et du Ca (Becker et al. 2008; Weatherall et al. 2006a; b). Dans ce système, le faisceau ionique est filtré par un quadripôle (seule la masse définie est conservée dans le faisceau ionique). Les ICP-MS ne sont équipés que d'un seul détecteur et ne permettent donc pas la mesure simultanée de plusieurs masses différentes. En conséquence, la précision et la résolution de ce système sont moindres par rapport aux systèmes TIMS ou MC-ICP-MS. Cependant, l'achat et l'entretien de systèmes ICP-MS est beaucoup moins onéreux que des systèmes TIMS ou MC-ICP-MS. De plus, les temps d'analyses sur ICP-MS sont beaucoup plus courts : généralement autour de 5 à 6 min.échantillon⁻¹ au lieu de 40 min.échantillon⁻¹ pour Mg sur MC-ICP-MS et 1 à 2 h.échantillon⁻¹ pour Ca sur TIMS. Enfin, dans de nombreux cas, au vue de la précision et de la résolution de l'instrument, l'étape de purification chimique n'est pas requise pour l'analyse sur ICP-MS. Les systèmes ICP-MS peuvent donc être une solution pour les analyses de rapports isotopiques dans le cadre d'expériences de traçage isotopique où le nombre d'échantillons est élevé et la précision d'analyse requise est moindre que pour des études de variations isotopiques naturelles.

En spectrométrie de masse, il existe plusieurs grands types de biais analytiques : le fractionnement instrumental et les interférences spectrales. Selon les cas et la précision recherchée, ces biais peuvent être soit corrigé post-analytiquement par des équations mathématiques, soit éviter par des traitements pré-analytiques (étape de purification de l'échantillon).

IV.3.1. Le fractionnement instrumental

Le fractionnement instrumental ou biais de masse correspond à la sur ou sous-estimation d'un rapport isotopique lors de l'analyse.

1. Le fractionnement instrumental a lieu dès l'ionisation de l'échantillon : la ionisation de certains isotopes d'un même élément peut requérir plus d'énergie que les autres isotopes (TIMS), les collisions entre les ions et l'argon dans le plasma (ICP) favorisent la perte des éléments les plus légers.
2. Lors de l'extraction des ions, les isotopes lourds sont concentrés vers le centre du plasma, tandis que les isotopes légers sont excentrés. Les isotopes lourds sont alors transmis préférentiellement dans l'analyseur,
3. lors de l'accélération du faisceau d'ions à travers les lentilles de focalisation, les électrons sont alors éliminés, et seuls les ions positifs sont accélérés. Il se produit alors des répulsions électrostatiques entre ces ions, induisant un décentrage des isotopes légers du faisceau d'ions.

Le fractionnement instrumental est corrigé post-analytiquement. Pour les systèmes ICP-MS, le fractionnement instrumental est indépendant de l'échantillon et la dérive temporelle du fractionnement instrumental est supposé linéaire. Pour corriger le fractionnement instrumental, des standards de composition isotopique connue sont insérés dans les séries d'échantillons. Le fractionnement instrumental est mesuré pour chaque standard puis extrapolé pour chaque échantillon.

IV.3.2. Les interférences spectrales

Les interférences spectrales correspondent à la détection simultanée par l'appareil des masses de 2 espèces différentes. Les rapports m/z de ces espèces étant très proches, la résolution de l'appareil peut être trop faible pour les distinguer. Il existe trois types d'interférences spectrales :

- **les interférences isobariques** correspondent aux éléments présentant des isotopes de même masse (différence de masse inférieure à la résolution). Par exemple, le potassium et l'argon présente un isotope de masse proche de 40 (^{40}Ca).
- **les interférences polyatomiques** sont issues de la formation des espèces moléculaires ioniques. Ces interférences résultent de la recombinaison entre des espèces présentes dans la matrice et/ou avec les ions du plasma. Des éléments constitutifs des produits utilisés pour la préparation des échantillons peuvent participer à ces recombinaisons.
- **les interférents divalents** peuvent se former dans le plasma (formation d'ion avec 2 charges positives). Ils correspondent aux éléments dont la masse est deux fois plus grande que la masse de l'isotope analysée : ^{51}V , ^{52}Cr (interférence sur la masse 26), ^{87}Rb , ^{87}Sr , ^{88}Sr , ^{89}Y (interférence sur la masse 44).

Des traitements chimiques des échantillons s'imposent et constituent la principale technique de résolution des interférences liées à la matrice (Galy et al. 2001; Wombacher et al. 2009). Ces traitements chimiques consistent à séparer le Mg des autres éléments de la matrice afin d'obtenir une fraction mono-élémentaire de Mg ou de Ca. Les différents protocoles de purification chimique ont communément recouru à la chromatographie ionique (Chang et al. 2003; Schmitt et al. 2009; Wombacher et al. 2009). Un fractionnement isotopique peut s'opérer durant cette étape de purification. Il est donc impératif de récupérer 100% du Mg ou du Ca initialement dans l'échantillon. Cette étape de purification chimique est aussi souvent longue et doit être réalisée dans des laboratoires propres (salle blanche) pour éviter toute contamination des échantillons.

La connaissance de la précision, la répétabilité et de la justesse des mesures de rapports isotopiques est essentielle pour pouvoir définir les erreurs de mesures et déterminer la limite de détection des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca (seuil au-delà duquel on considère que l'enrichissement mesuré n'est pas simplement lié aux variations isotopiques naturelle ou à la variabilité analytique mais est dû à la présence de traceurs isotopiques dans l'échantillon). Enfin, il est aussi essentiel de vérifier les différents biais analytiques (interférences spectrales, interférences non-spectrales, biais de masse).

V. Objectifs de la thèse

Les incohérences et paradoxes entre les résultats expérimentaux et modélisés discutés précédemment met en évidence les limites de nos connaissances sur le fonctionnement biogéochimique des écosystèmes forestiers à faible fertilité minérale et les limites des approches conventionnelles pour étudier la fertilité de ces sols forestiers et leurs évolutions au cours du temps. De nouveaux outils et de nouvelles approches sont donc nécessaires pour étudier les cycles biogéochimiques notamment du magnésium et du calcium. Le développement de la spectrométrie de masse a permis d'étudier les variations isotopiques naturelles du calcium et du magnésium et de tracer des sources et des processus dans les écosystèmes forestiers. Cependant, cette approche est limitée par les très faibles variations isotopiques naturelles du calcium et du magnésium. Enfin, l'utilisation de matériel isotopiquement enrichi pour marquer les pools et tracer les flux de calcium et de magnésium bien que très prometteuse n'a pas été mise en œuvre *in situ* à l'échelle de l'écosystème.

L'objectif principal de cette thèse était d'améliorer la quantification *in situ* des flux et pools de calcium et magnésium dans un écosystème forestier à faible fertilité minérale. Pour cela, nous avons tout d'abord établi des bilans de flux « entrées-sorties » (approche conventionnelle pour appréhender ces pools et flux) dans un peuplement de hêtre âgé de 35 ans sur le site expérimental de Breuil-Chenu (Bourgogne, France). Une expérience de multi-traçage isotopique (^2H , ^{26}Mg et ^{44}Ca) a ensuite été conduite dans cette même placette :

Les étapes de ce travail de thèse sont les suivantes :

- (1) Quantifier les flux d'eau dans le profil de sol à l'aide d'une expérience de traçage isotopique de l'eau (^2H) et de modèles hydriques (BILJOU et HYDRUS-1D) ;
- (2) Etudier les évolutions des réserves de magnésium et de calcium dans le sol de la placette de hêtre depuis sa plantation en 1976 par 2 approches « conventionnelles » (comparaison des réserves mesurées en 1974 et en 2001 et calcul des bilans de flux « entrées-sorties » sur 2003-2008) ;
- (3) Développer les protocoles d'analyses isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ sur ICP-MS pour les différents échantillons prélevés au cours de l'expérience de multi-traçage isotopique.
- (4) Etudier les dynamiques et vitesses de transfert vertical des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans le profil de sol ;
- (5) Etudier le prélèvement des traceurs isotopiques dans le profil de sol : cartographie du prélèvement dans le profil de sol, dynamiques de translocation des racines vers les feuilles vertes ;
- (6) Tester les flux et les bilans de flux « entrées-sorties » (calcium et magnésium) (calculés en (2)) en mesurant la dilution isotopique des traceurs apportés.

VI. Références bibliographiques

- Aherne J, Posch M, Forsius M, Vuorenmaa J, Tamminen P, Holmberg M and Johansson M 2008 Modelling the hydro-geochemistry of acid-sensitive catchments in Finland under atmospheric deposition and biomass harvesting scenarios. *Biogeochemistry* 88, 233-256.
- Akelsson C, Westling H, Sverdrup H and Gundersen P 2007 Nutrient and carbon budgets in forest soils as decision support in sustainable forest management. *Forest Ecol Manag* 238, 167-174.
- Alewell C, Manderscheid B, Gerstberger P and Matzner E 2000 Effects of reduced atmospheric deposition on soil solution chemistry and elemental contents of spruce needles in NE-Bavaria, Germany. *J. Plant Nutr. Soil Sci.-Z. Pflanzenernahr. Bodenkd.* 163, 509-516.
- Aloni R, Enstone D E and Peterson C A 1998 Indirect evidence for bulk water flow in root cortical cell walls of three dicotyledonous species. *Planta* 207, 1-7.
- Altveg M 1998 Dynamics of Forest Soil Chemistry. p. 94. Lund University Lund, Sweden.
- Amini M, Eisenhauer A, Boehm F, Holmden C, Kreissig K, Hauff F and Jochum K P 2009 Calcium Isotopes (δ Ca-44/40) in MPI-DING Reference Glasses, USGS Rock Powders and Various Rocks: Evidence for Ca Isotope Fractionation in Terrestrial Silicates. *Geostandards and Geoanalytical Research* 33, 231-247.
- Arocena J M, Velde B and Robertson S J 2011 Weathering of biotite in the presence of arbuscular mycorrhizae in selected agricultural crops. *Applied Clay Science*.
- Augusto L, Zeller B, Midwood A J, Swanston C, Dambrine E, Schneider A and Bosc A 2011 Two-year dynamics of foliage labelling in 8-year-old *Pinus pinaster* trees with (^{15}N) , (^{26}Mg) and (^{42}Ca) -simulation of Ca transport in xylem using an upscaling approach. *Ann For Sci* 68, 169-178.
- Bailey S W, Horsley S B and Long R P 2005 Thirty Years Of Change In Forest Soils Of The Allegheny Plateau, Pennsylvania. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 681-690.
- Barber S A 1995 Soil nutrient bioavailability : a mechanistic approach. Wiley, New York [etc.].
- Barrett K, Hjellbrekke A G, Tarrason L and Schaug J 2000 An evaluation of trends for concentrations in air and precipitation. In *Transboundary acidification and eutrophication in Europe, EMEP Summary Report 2000*. Eds. L Tarrason and J Schaug. pp 41-48. Norwegian meteorological institute, Oslo, Norway.
- Becker J S, Fullner K, Seeling U D, Fornalczyk G and Kuhn A J 2008 Measuring magnesium, calcium and potassium isotope ratios using ICP-QMS with an octopole collision cell in tracer studies of nutrient uptake and translocation in plants. *Anal Bioanal Chem* 390, 571-578.
- Becker M W and Coplen T B 2001 Use of deuterated water as a conservative artificial groundwater tracer. *Hydrogeol. J.* 9, 512-516.
- Bedison J E and Johnson A H 2010 Seventy-Four Years of Calcium Loss from Forest Soils of the Adirondack Mountains, New York. *Soil Sci Soc Am J* 74, 2187-2195.
- Belanger N, Pare D, Bouchard M and Daoust G 2004 Is the use of trees with superior growth a threat to soil nutrient availability? A case study with Norway spruce. *Canadian journal of forestry research* 34, 560-572.
- Belyazid S, Kurz D, Braun S, Sverdrup H, Rihm B and Hettelingh J-P 2011 A dynamic modelling approach for estimating critical loads of nitrogen based on plant community changes under a changing climate. *Environ Pollut* 159, 789-801.
- Binkley D and Richter D 1987 Nutrient cycles and H⁺ budgets of forest ecosystems. *Advances in Ecological Research* 16, 1-51.
- Black J R, Epstein E, Rains W D, Yin Q Z and Casey W H 2008 Magnesium-isotope Fractionation During Plant Growth. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7831-7836.
- Black J R, Yin Q Z and Casey W H 2006 An experimental study of magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-a photosynthesis. *Geochim Cosmochim* 70, 4072-4079.
- Boisvenue C and Running S W 2006 Impacts of climate change on natural forest productivity - evidence since the middle of the 20th century. *Glob Change Biol* 12, 1-21.
- Bolou-Bi E B, Poszwa A, Leyval C and Vigier N 2010 Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geochim Cosmochim* 74, 2523-2537.

- Bolou-Bi E B, Vigier N, Brenot A and Poszwa A 2009 Magnesium Isotope Compositions of Natural Reference Materials. *Geostandards and geoanalytical research* 33, 95-109.
- Bolou-Bi E B, Vigier N, Poszwa A, Boudot J P and Dambrine E 2012 Effects of biogeochemical processes on magnesium isotope variations in a forested catchment in the Vosges Mountains (France). *Geochim Cosmochim* 87, 341-355.
- Bolou Bi E 2009 Etude du rôle de la végétation dans le cycle biogéochimique du magnésium: approche isotopique. p. 286. Université Henri Poincaré, Nancy.
- Bonneau M 1995 Fertilisation des forêts dans les pays tempérés. ENGREF, Nancy. pp. 367.
- Bonneau M, bonnaud P, Gelhaye D and Ranger J 2006 Observatoire de la qualité des sols (O.Q.S.) du Donon : contenu et flux de Ca, Mg et K après la tempête de 1999. In *Etude et gestion des sols (L')*.
- Bonneau M, Dambrine E, Nys C and Ranger J 1991 Apports acides et cycle des cations dans des pessières du Nord-Est. Intérêt de bilans saisonniers. *Science du sol* 29, 125-145.
- Bontemps J D 2006 Productivity changes in pure and regular stands of beech (*Fagus sylvatica* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.) in the Northern half of France during the XXth century. In *LERFoB*. p. 512. Agroparistech-ENGREF, Nancy.
- Bormann F H and Likens G E 1967 Nutrient cycling. *Science* 155, 424-429.
- Boxman A W, Peters R C J H and Roelofs J G M 2008 Long term changes in atmospheric N and S throughfall deposition and effects on soil solution chemistry in a Scots pine forest in the Netherlands. *Environ Pollut* 156, 1252-1259.
- Boyle J R, Phillips J J and Ek A R 1973 'Whole tree' harvesting: nutrient budget evaluation. *J. For.* 71, 760-762.
- Brenot A, Cloquet C, Vigier N, Carignan J and France-Lanord C 2008 Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochim Cosmochim* 72, 5070-5089.
- Brooks, J.R., Barnard, H.R., Coulombe, R., McDonnell, J.J., 2010. Ecohydrologic separation of water between trees and streams in a Mediterranean climate. *Nat. Geosci.* 3(2), 100-104.
- Bruijnzeel L A 1991 Nutrient input-output budget of tropical forest ecosystems - a review. *Journal of Tropical Ecology* 7, 1-24.
- Brumme R, Meesenburg H, Bredemeier M, Jacobsen C, Schönfelder E, Meiwes K J and Eichhorn J 2009 Changes in soil solution chemistry, seepage losses, and input-output budgets at three beech forests in response to atmospheric deposition. In *Ecological studies 208 - Functioning and Management of European Beech Ecosystems*. Eds. R Brumme and P K Khanna. pp 303-336. Springer, Berlin Heidelberg.
- Bucking H, Kuhn A J, Schroder W H and Heyser W 2002 The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? *J. Exp. Bot.* 53, 1659-1669.
- Bullen T D and Bailey S W 2005 Identifying calcium sources at an acid deposition-impacted spruce forest: a strontium isotope, alkaline earth element multi-tracer approach. *Biogeochemistry* 74, 63-99.
- Calvaruso C, Turpault M-P and Frey-Klett P 2006 Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1258-1266.
- Genki-Tok B, Chabaux F, Lemarchand D, Schmitt A-D, Pierret M-C, Viville D, Bagard M-L and Stille P 2009 The impact of water-rock interaction and vegetation on calcium isotope fractionation in soil- and stream waters of a small, forested catchment (the Strengbach case). *Geochim Cosmochim* 73 2215-2228.
- Chang V T C, Makishima A, Belshaw N S and O'Nions R K 2003 Purification of Mg from low-Mg biogenic carbonates for isotope ratio determination using multiple collector ICP-MS. *J Anal Atom Spectrom* 18, 296-301.
- Chu N-C, Henderson G M, Belshaw N S and Hedges R E M 2006 Establishing the potential of Ca isotopes as proxy for consumption of dairy products. *Applied Geochemistry* 21, 1656-1667.
- CITEPA <http://www.citepa.org/fr/pollution-et-climat/polluants/aep-item>. Décembre 2012.
- Cobert F 2012 Processus et mécanismes physico-chimiques et biologiques responsables du fractionnement des isotopes du calcium. p. 217. Université de Strasbourg.
- Cobert F, Schmitt A D, Bourgeade P, Labolle F, Badot P M, Chabaux F and Stille P 2011 Experimental identification of Ca isotopic fractionations in higher plants. *Geochim Cosmochim* 75, 5467-5482.

- Cooper D M 2005 Evidence of sulphur and nitrogen deposition signals at the United Kingdom Acid Waters Monitoring Network sites. *Environ Pollut* 137, 41-54.
- Cosby B J, Ferrier R C, Jenkins A and Wright R F 2001 Modelling the effects of acid deposition: refinements, adjustments and inclusion of nitrogen dynamics in the MAGIC model. *Hydrology and Earth System Sciences* 5, 499-517.
- Cosby B J, Hornberger G M, Galloway J N and Wright R F 1985a Modeling the effects of acid deposition - Assessment of a lumped parameter model of soil-water and streamwater chemistry. *Water resources research* 21, 51-63.
- Cosby B J, Wright R F, Hornberger G M and Galloway J N 1985b Modeling the effects of acid deposition - estimation of long-term water-quality responses in a small forested catchment. *Water resources research* 21, 1591-1601.
- Dambrine E, Pollier B, Bonneau M and Ignatova N 1998a Use of artificial trees to assess dry deposition in spruce stands. *Atmos Environ* 32, 1817-1824.
- Dambrine E, Pollier B, Poszwa A, Ranger J, Probst A, Viville D, Biron P and Granier A 1998b Evidence of current soil acidification in spruce stands in the Vosges Mountains, north-eastern France. *Water Air Soil Pollut.* 105, 43-52.
- Dambrine E, Vega J A, Taboada T, Rodriguez L, Fernandez C, Macias F and Gras J M 2000 Budgets of mineral elements in small forested catchments in Galicia (NW Spain). *Ann For Sci* 57, 23-38.
- Dawson T E, Mambelli S, Plamboeck A H, Templer P H and Tu K P 2002 Stable isotopes in plant ecology. *Annual review ecological systems* 33, 507-559.
- De La Rocha C L and DePaolo D J 2000 Isotopic Evidence for Variations in the Marine Calcium Cycle Over the Cenozoic. *Science* 289, 1176-1178.
- de Villiers S, Dickson J A D and Ellam R M 2005 The composition of the continental river weathering flux deduced from seawater Mg isotopes. *Chem Geol* 216, 133-142.
- de Vries W and Kros J 1991 Assessment of Critical Loads and the Impact of Deposition Scenarios by Steady State and Dynamic Soil Acidification Models. In *Studies in Environmental Science*. Eds. G J Heij and T Schneider. pp 569-624. Elsevier.
- de Vries W, Posch M, Oja T, van Oene H, Kros H, Warfvinge P and Arp P A 1995 Modelling critical loads for the Solling spruce site. *Ecol Model* 83, 283-293.
- DePaolo D J 2004 Calcium isotopic variations produced by biological, kinetic, radiogenic and nucleosynthetic processes. In *Geochemistry of Non-Traditional Stable Isotopes*. Eds. C M Johnson, B L Beard and F Albarede. pp 255-288. Mineralogical Soc America, Washington.
- Edwards C A and Bohlen P J 1996 *Biology and ecology of earthworms*. Chapman and Hall Ltd, London, UK.
- Epron D, Bahn M, Derrien D, Lattanzi F A, Pumpanen J, Gessler A, Hoegberg P, Maillard P, Dannoura M, Gerant D and Buchmann N 2012 Pulse-labelling trees to study carbon allocation dynamics: a review of methods, current knowledge and future prospects. *Tree Physiol* 32, 776-798.
- Ericsson K 2004 Bioenergy policy and market development in Finland and Sweden. *Energy policy* 32, 1707-1721.
- Ewing S A, Yang W, DePaolo D J, Michalski G, Kendall C, Stewart B, Thiemens M and Amundson R 2008 Non-biological fractionation of stable Ca isotopes in soils of the Atacama Desert, Chile. *Geochim Cosmochim* 72 1096-1110.
- FAO 2010 *Global Forest Resources Assessment 2010 Main Report*. p. 378, Rome.
- Farkaš J, Déjeant A, Novák M and Jacobsen S B 2011 Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca²⁺ in a base-poor forest: A new concept of combining stable ($\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$) and radiogenic (ϵCa) signals. *Geochim Cosmochim* 75, 7031-7046.
- FCBA 2009 *Mémento FCBA 2008-2009*. http://www.fcba.fr/librairie/docs/memento_2008_2009.pdf Décembre 2012.
- FCBA 2012 *Mémento FCBA 2012*. http://www.fcba.fr/documentation/plaquettes/memento_2012.pdf Décembre 2012.
- Fichter J 1997 *Minéralogie quantitative et flux d'éléments minéraux libéré par altération des minéraux des sols dans deux écosystèmes sur granite (bassin versant du Strengbach, Vosges)*. p. 284. Université de Nancy I, Nancy.
- Fichter J, Dambrine E, Turpault M P and Ranger J 1998 Base cation supply in spruce and beech ecosystems of the Strengbach catchment (Vosges mountains, N-E France). *Water Air Soil Pollut.* 104, 125-148.

- Forsius M, Alveteg M, Jenkins A, Johansson M, Kleemola S, Lukewille A, Posch M, Sverdrup H and Walse C 1998 MAGIC, SAFE and SMART model applications at integrated monitoring sites: Effects of emission reduction scenarios. *Water Air Soil Pollut.* 105, 21-30.
- Franceschi V R and Nakata P A 2005 Calcium oxalate in plants: Formation and function. In *Annual Review of Plant Biology*. pp 41-71. Annual Reviews, Palo Alto.
- Galy A, Belshaw N S, Halicz L and O'Nions R K 2001 High-precision measurement of magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* 208, 89-98.
- Gopalan K, Macdougall D and Macisaac C 2006 Evaluation of a ^{42}Ca - ^{43}Ca double spike for high precision Ca isotope analysis. *Int J Mass Spectrom* 248, 9-16.
- Gottlein A, Heim A, Kuhn A J and Schroder W H 2005 In-situ application of stable isotope tracers in the rhizosphere of an oak seedling. *Eur. J. For. Res.* 124, 83-86.
- Goutal 2012 Modifications et restauration de propriétés physiques et chimiques de deux sols forestiers soumis au passage d'un engin d'exploitation. p. 223. AgroParisTech, Nancy.
- Granier A, Bréda N, Biron P and Villette S 1999 A lumped water balance model to evaluate duration and intensity of drought constraints in forest stands. *Ecol Model* 116, 269-283.
- Halicz L, Galy A, Belshaw N S and O'Nions R K 1999 High-precision measurement of calcium isotopes in carbonates and related materials by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS). *J Anal Atom Spectrom* 14, 1835-1838.
- Hazlett P W, Curry J M and Weldon T P 2011 Assessing Decadal Change in Mineral Soil Cation Chemistry at the Turkey Lakes Watershed. *Soil Sci Soc Am J* 75, 287-305.
- Hedin L O and Likens G E 1996 Atmospheric dust and acid rain. *Sci Am* 275, 88-92.
- Henderson G S, Swank W T, Waide J B and Grier C C 1978 Nutrient budgets of Appalachian and cascade region watersheds - comparison. *Forest Science* 24, 385-397.
- Heuser A, Eisenhauer A, Gussone N, Bock B, Hansen B T and Nagler T F 2002 Measurement of calcium isotopes ($\delta^{44}\text{Ca}$) using a multicollector TIMS technique. *Int J Mass Spectrom* 220, 385-397.
- Hindshaw R, Reynolds B, Wiederhold J, Kiczka M, Kretzschmar R and Bourdon B 2012 Calcium isotope fractionation in alpine plants. *Biogeochemistry*, 1-16.
- Hindshaw R S, Reynolds B C, Wiederhold J G, Kretzschmar R and Bourdon B 2011 Calcium isotopes in a proglacial weathering environment: Damma glacier, Switzerland. *Geochim Cosmochim* 75, 106-118.
- Hobbie E A and Werner R A 2004 Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C-3 and C-4 plants: a review and synthesis. *New Phytol* 161, 371-385.
- Hodson M E, Langan S J and Wilson M J 1996 A sensitivity analysis of the PROFILE model in relation to the calculation of soil weathering rates. *Applied Geochemistry* 11, 835-844.
- Hoefs J 2009 *Stable Isotope Geochemistry*, 6th Edition. Springer-Verlag, Germany. pp. 285.
- Holmden C 2005 Measurement of $\delta^{44}\text{Ca}$ using a ^{43}Ca - ^{42}Ca double-spike TIMS Technique. *Summary of Investigations 2005 Volume 1*, 7.
- Holmden C and Bélanger N 2010 Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochim Cosmochim* 74, 995-1015.
- Holmqvist J 2001 *Modelling chemical weathering in different scales*. p. 98. Lund University, Lund, Sweden.
- Hornbeck J W, Bailey S W, Buso D C and Shanley J B 1997 Streamwater chemistry and nutrient budgets for forested watersheds in New England: Variability and management implications. *Forest Ecol Manag* 93, 73-89.
- Huntington T G 2005 Assessment of calcium status in Maine forests: review and future projection. *Canadian journal of forestry research* 35, 1109-1121.
- IPCC 2007 Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on climate Change, 2007. Eds. S Solomon, D Qin, M Manning, Z Chen, M Marquis, K B Averyt, M Tignor and H L Miller. p. 996. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Jandl R, Alewell C and Prietzel J 2004 Calcium loss in Central European forest soils. *Soil Sci Soc Am J* 68, 588-595.
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn A J, Schroder W H, Becker J S and Godbold D L 2000 The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant Soil* 220, 243-246.
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn A J, Schröder W H and Godbold D L 2001 Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* 149, 327-337.
- Johnson A H, Andersen S B and Siccama T G 1994 Acid-rain and soils of the Adirondacks 1. CHanges in pH and available calcium, 1930-1984. *Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For.* 24, 39-45.
- Johnson A H, Moyer A, Bedison J E, Richter S L and Willig S A 2008a Seven Decades of Calcium Depletion in Organic Horizons of Adirondack Forest Soils *Soil Sci. Soc. Am. J.* 72, 1824-1830.
- Johnson D W, Henderson G S and Todd D E 1988 Changes in nutrient distribution in forests and soils of Walker Branch watershed, Tennessee, over an 11-year period. *Biogeochemistry* 5, 275-293.
- Johnson D W, Sogn T and kvindesland S 2000 The Nutrient Cycling model: lessons learned. *Forest Ecol Manag* 138, 91-106.
- Johnson D W, Swank W T and Vose J M 1993 Simulated effects of atmospheric sulfur deposition on nutrient cycling in a mixed deciduous forest. *Biogeochemistry* 23, 169-196.
- Johnson D W and Todd D E 1998 Harvesting effects on long-term changes in nutrient pools of mixed oak forest. *Soil Sci Soc Am J* 62, 1725-1735.
- Johnson D W, Todd D E, Jr., Trettin C F and Mulholland P J 2008b Decadal Changes in Potassium, Calcium, and Magnesium in a Deciduous Forest Soil. *Soil Sci Soc Am J* 72, 1795-1805.
- Johnson D W, West D C, Todd D E and Mann L K 1982 Effects of Sawlog vs. Whole-Tree Harvesting on the Nitrogen, Phosphorus, Potassium, and Calcium Budgets of an Upland Mixed Oak Forest1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 1304-1309.
- Jonard M, André F, Dambrine E, Ponette Q and Ulrich E 2009 Temporal trends in the foliar nutritional status of the French, Walloon and Luxembourg broad-leaved plots of forest monitoring. *Ann For Sci* 66, 412-421.
- Jonard M, Legout A, Nicolas M, Dambrine E, Nys C, Ulrich E, van der Perre R and Ponette Q 2012 Deterioration of Norway spruce vitality despite a sharp decline in acid deposition: a long-term integrated perspective. *Glob Change Biol* 18, 711-725.
- Jongmans A G, vanBreemen N, Lundstrom U, vanHees P A W, Finlay R D, Srinivasan M, Unestam T, Giesler R, Melkerud P A and Olsson M 1997 Rock-eating fungi. *Nature* 389, 682-683.
- Kammer A and Hagedorn F 2011 Mineralisation, leaching and stabilisation of C-13-labelled leaf and twig litter in a beech forest soil. *Biogeosciences* 8, 2195-2208.
- Klaminder J, Lucas R W, Futter M N, Bishop K H, Kohler S J, Egnell G and Laudon H 2011 Silicate mineral weathering rate estimates: Are they precise enough to be useful when predicting the recovery of nutrient pools after harvesting? *Forest Ecol Manag* 261, 1-9.
- Koeniger P, Leibundgut C, Link T and Marshall J D 2010 Stable isotopes applied as water tracers in column and field studies. *Org. Geochem.* 41, 31-40.
- Kohne J M, Kohne S and Simunek J 2009 A review of model applications for structured soils: (a) Water flow and tracer transport. *Journal of Contaminant Hydrology* 104, 4-35.
- Kuhn A J, Bauch J and Schroder W H 1995 Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant Soil* 168-169, 135-150.
- Kuhn A J, Schroder W H and Bauch J 1997 On the distribution and transport of mineral elements in xylem, cambium and phloem of spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Holzforschung* 51, 487-496.
- Kuhn A J, Schroder W H and Bauch J 2000 The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots. *Planta* 210, 488-496.
- Kvindesland S 1997 The Nutrient Cycling Model (NuCM) User Manual. p. 40. Agricultural University of Norway - Department of soil wand water sciences, Aas.
- Laclau J P, Ranger J, Deleporte P, Nouvellon Y, Saint-Andre L, Marlet S and Bouillet J P 2005 Nutrient cycling in a clonal stand of Eucalyptus and an adjacent savanna ecosystem in Congo 3. Input-output budgets and consequences for the sustainability of the plantations. *Forest Ecol Manag* 210, 375-391.

- Landmann G and Bonneau M 1995 Forest decline and atmospheric deposition effects in the french mountains. Springer Verlag, Berlin. pp. 461.
- Langan S, Fransson L and Vanguelova E 2009 Dynamic modelling of the response of UK forest soils to changes in acid deposition using the SAFE model. *Science of The Total Environment* 407, 5605-5619.
- Lefèvre Y 1997 Essai de mise en évidence d'une évolution récente du pH et de la teneur en cations « basiques » de quelques sols forestiers des Vosges (nord-est de la France). *Ann. For. Sci.* 54, 483-492.
- Legout A 2008 Cycles Biogéochimiques et bilans de fertilité minérale en hêtraies de plaine. p. 281. AGROPARISTECH-ENGREF, Nancy.
- Legout A, Legout C, Nys C and Dambrine E 2009 Preferential flow and slow convective chloride transport through the soil of a forested landscape (Fougères, France). *Geoderma* 151, 179-190.
- Lequy E, Conil S and Turpault M P 2012 Impacts of Aeolian dust deposition on European forest sustainability: A review. *Forest Ecol Manag* 267, 240-252.
- Lesack L F W and Melack J M 1996 Mass balance of major solutes in a rainforest catchment in the Central Amazon: Implications for nutrient budgets in tropical rainforests. *Biogeochemistry* 32, 115-142.
- Likens G E, Bormann F H, Pierce R S, Eaton J S and Johnson N M 1977 *Biogeochemistry of a forested ecosystem*. pp. ix + 150 pp.-ix + 150 pp.
- Likens G E, Driscoll C T and Buso D C 1996 Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. *Science* 272, 244-246.
- Liu S, Munson R K, Johnson D W, Gherini S A, Summers K V, Hudson R J M, Wilkinson K J and Pitelka L F 1991 The Nutrient Cycling Model (NuCM): Overview and application. In *Atmospheric Deposition and Forest Nutrient Cycling: A synthesis of the Intergrated Forest Study*. Eds. D W Johnson and S E Lindberg. pp 583-609. Springer-Verlag, New-York.
- Lowrance R R, Todd R L and Asmussen L E 1983 waterborne nutrient budgets for the riparian zone of an agricultural watershed. *Agriculture Ecosystems & Environment* 10, 371-384.
- Mantau U, Steierer F, Verkerk H, Lindner M, Anttila P, Asikainen A, Oldenburger J, Leek N and Prins K 2010 Euwood – real potential for changes in growth and use of EU forests. Final Report. p. 160. University of Hamburg (Centre of Wood Science) Hamburg, Germany.
- Marc V and Robinson M 2004 Application of the deuterium tracing method for the estimation of tree sap flow and stand transpiration of a beech forest (*Fagus sylvatica* L.) in a mountainous Mediterranean region. *J Hydrol* 285, 248-259.
- Marques R, Ranger J, Gelhaye D, Pollier B, Ponette Q and Goedert O 1996 Comparison of chemical composition of soil solutions collected by zero-tension plate lysimeters with those from ceramic-cup lysimeters in a forest soil. *Eur J Soil Sci* 47, 407-417.
- Marschner H 1995 *Mineral nutrition of higher plants*. Academic, London. pp. 889.
- Marshall B D and Depaolo D J 1982 PRECISE AGE-DETERMINATIONS AND PETROGENETIC STUDIES USING THE K-CA METHOD. *Geochim Cosmochim* 46, 2537-2545.
- Matzner E and Meiwes K J 1994 Long-term development of element fluxes with bulk precipitation and throughfall in two forested ecosystems of the German Solling area. *J Environ Qual* 23, 162-166.
- McLaughlin S B and Wimmer R 1999 Tansley Review No. 104 Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *New Phytol* 142, 373-417.
- Meesenburg H, Eichhorn J and Meiwes K J 2009 Atmospheric deposition and canopy interactions. In *Ecological Studies 208 - Functioning and Management of European Beech Ecosystems*. Eds. R Brumme and P K Khanna, Berlin Heidelberg.
- Meija J, Yang L, Sturgeon R and Mester Z 2009 Mass Bias Fractionation Laws for Multi-Collector ICPMS: Assumptions and Their Experimental Verification. *Anal. Chem.* 81, 6774-6778.
- Merganičová K, Pietsch S A and Hasenauer H 2005 Testing mechanistic modeling to assess impacts of biomass removal. *Forest Ecol Manag* 207, 37-57.
- Metzner R, Thorpe M R, Breuer U, Blumler P, Schurr U, Schneider H U and Schroeder W H 2010 Contrasting dynamics of water and mineral nutrients in stems shown by stable isotope tracers and cryo-SIMS. *Plant Cell Environ.* 33, 1393-1407.
- Midwood A J, Proe M F and Harthill J J 2000 Use and analysis by thermal ionisation mass spectrometry of Mg-26 and K-41 to assess mineral uptake in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Analyst* 125, 487-492.

- Miller D E and Watmough S A 2009 Soil acidification and foliar nutrient status of Ontario's deciduous forest in 1986 and 2005. *Environ Pollut* 157, 664-672.
- Morgan J L L, Gordon G W, Arrua R C, Skulan J L, Anbar A D and Bullen T D 2011 High-Precision Measurement of Variations in Calcium Isotope Ratios in Urine by Multiple Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 83, 6956-6962.
- Munson R K, Liu S, Gherini S A, Johnson D W, Wilkinson K J, Hudson R J M, White K S and Summers K V 1992 NuCM code version 2.0: an IBM PC code for simulating nutrient cycling in forest ecosystems final report. p. 130. Electric Power Research Institute.
- Nageleisen L-M and Huart O 2005 Problèmes sanitaires d'actualité en hêtraie: la maladie du hêtre dans les Ardennes. *Revue Forestière Française* LVII, 249-254.
- Nageleisen L-M and Reuter J-C 2007 Dépérissements de hêtre : retour sur les situations de crise de la hêtraie au cours de la dernière décennie. Bilan de la santé des forêts en 2006, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Département de la Santé des Forêts, Antenne de Nancy.
- Nakata P A 2003 Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164, 901-909.
- Nicolas M, Charnet F, Ranger J, Rantien C, Brêthes A, Mengin-Lecreux P and Sardin T 2007 Bois-énergie: maîtriser les impacts. *Rendez-vous technique de l'ONF* 15, 36-45.
- Norton S A and Young H E 1976 Forest biomass utilization and nutrient budgets. Oslo biomass studies. Papers presented during the meeting of S4.01 [Mensuration, Growth and Yield] in Oslo, Norway, June 22, 1976. XVIth International Congress of IUFRO., 55-73.
- Nys C, Collet R and Legout A 2010 Dossier d'expertise : carte de fertilité chimique et calcul des besoins en nutriments des hêtraies de la Vogé en vue d'un amendement. *Rapports individuels de 6 pages transmis à 13 communes de la Vogé.* INRA.
- Oliver S and Barber S A 1966 An Evaluation of the Mechanisms Governing the Supply of Ca, Mg, K, and Na to Soybean Roots (*Glycine max*)¹. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 30, 82-86.
- Page B D, Bullen T D and Mitchell M J 2008 Influences of calcium availability and tree species on Ca isotope fractionation in soil and vegetation. *Biogeochemistry* 88, 1-13.
- Perakis S, Maguire D, Bullen T, Cromack K, Waring R and Boyle J 2006 Coupled nitrogen and calcium cycles in forests of the Oregon Coast Range. *Ecosystems* 9, 63-74.
- Pogge von Strandmann P A E, Burton K W, James R H, van Calsteren P, Gislason S R and Sigfusson B 2008 The influence of weathering processes on riverine magnesium isotopes in a basaltic terrain. *Earth and Planet Sc Lett* 276, 187-197.
- Poszwa A, Dambrine E, Pollier B and Fichter J 1998 Mise en évidence directe de l'acidification d'un sol forestier à Aubure. *Ecologie* 29, 407-410.
- Proe M F, Midwood A J and Craig J 2000 Use of stable isotopes to quantify nitrogen, potassium and magnesium dynamics in young Scots pine (*Pinus sylvestris*). *New Phytol* 146, 461-469.
- Puech J 2009 Mise en valeur de la forêt française et développement de la filière bois. p. 75, Paris.
- Ranger J, Allie S, Gelhaye D, Pollier B, Turpault M P and Granier A 2002 Nutrient budgets for a rotation of a Douglas-fir plantation in the Beaujolais (France) based on a chronosequence study. *Forest Ecol Manag* 171, 3-16.
- Ranger J, Discours D, Mohamed A D, Moares C, Dambrine E, Merlet D and Rouiller J 1993 Comparison of the gravitational and the capillary water of three spruce (*Picea abies* Karst) stands in the Vosges - Usefulness for the identification of the current soil function and consequences for the health status of the stands. *Ann. Sci. For.* 50, 425-444.
- Ranger J, Marques R and Jussy J-H 2001 Forest soil dynamics during stand development assessed by lysimeter and centrifuge solutions. *Forest Ecol Manag* 144, 129-145.
- Ranger J and Turpault M-P 1999 Input-output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *Forest Ecol Manag* 122, 139-154.
- Reiners W A and Olson R K 1984 Effects of canopy components on throughfall chemistry - An experimental analysis. *Oecologia* 63, 320-330.
- Reuss J O and Johnson D W 1986 Acid deposition and the acidification of soils and waters. Springer-Verlag New York. pp. 119.

- Riofrio-Dillon, G., Bertrand, R., Gegout, J.C., 2012. Toward a recovery time: forest herbs insight related to anthropogenic acidification. *Glob Change Biol* 18(11), 3383-3394.
- Russell W A, Papanastassiou D A and Tombrello T A 1978 Ca isotope fractionation on Earth and other solar-system materials. *Geochim Cosmochim* 42, 1075-1090.
- Schmitt A-D 2003 Les isotopes du calcium: développements analytiques, application au bilan océanique présent et passé. In *Science de la Terre et de l'Univers*. p. 200. Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Schmitt A-D, Chabaux F and Stille P 2003 The calcium riverine and hydrothermal isotopic fluxes and the oceanic calcium mass balance. *Earth and Planet Sc Lett* 213, 503-518.
- Schmitt A-D, Gangloff S, Cobert F, Lemarchand D, Stille P and Chabaux F 2009 High performance automated ion chromatography separation for Ca isotope measurements in geological and biological samples. *J Anal Atom Spectrom* 24, 1089-1097.
- Schmitt A-D and Stille P 2005 The source of calcium in wet atmospheric deposits: Ca-Sr isotope evidence. *Geochim Cosmochim* 69, 3463-3468.
- Shaul O 2002 Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals* 15, 307-321.
- Sicard C, Saint-Andre L, Gelhaye D and Ranger J 2006 Effect of initial fertilisation on biomass and nutrient content of Norway spruce and Douglas-fir plantations at the same site. *Trees-Structure and Function* 20, 229-246.
- Simunek J, Jarvis N J, van Genuchten M T and Gardenas A 2003 Review and comparison of models for describing non-equilibrium and preferential flow and transport in the vadose zone. *J Hydrol* 272, 14-35.
- Skulan J and DePaolo D J 1999 Calcium isotope fractionation between soft and mineralized tissues as a monitor of calcium use in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13709-13713.
- Skulan J, DePaolo D J and Owens T L 1997 Biological control of calcium isotopic abundances in the global calcium cycle. *Geochim Cosmochim* 61, 2505-2510.
- Staelens J, Houle D, De Schrijver A, Neiryck J and Verheyen K 2008 Calculating Dry Deposition and Canopy Exchange with the Canopy Budget Model: Review of Assumptions and Application to Two Deciduous Forests. *Water Air Soil Poll* 191, 149-169.
- Starr M 1999 WATBAL: A model for estimating monthly water balance components, including soil water fluxes. In 8th Annual Report 1999. UN ECE ICP Integrated Monitoring. The Finnish Environment. Eds. S Kleemola and M Forsius. pp 325:321-325.
- Stoddard J L, Jeffries D S, Lukewille A, Clair T A, Dillon P J, Driscoll C T, Forsius M, Johannessen M, Kahl J S, Kellogg J H, Kemp A, Mannio J, Monteith D T, Murdoch P S, Patrick S, Rebsdorf A, Skjelkvåle B L, Stainton M P, Traaen T, van Dam H, Webster K E, Wieting J and Wilander A 1999 Regional trends in aquatic recovery from acidification in North America and Europe. *Nature* 401, 575-578.
- Susfalk R B and Johnson D W 2002 Ion exchange resin based soil solution lysimeters and snowmelt solution collectors. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33, 1261-1275.
- Sverdrup H and Rosen K 1998 Long-term base cation mass balances for Swedish forests and the concept of sustainability. *Forest Ecol Manag* 110, 221-236.
- Sverdrup H, Thelin G, Robles M, Stjernquist I and Sörensen J 2006 Assessing nutrient sustainability of forest production for different tree species considering Ca, Mg, K, N and P at Björnstorp Estate, Sweden *Biogeochemistry* 81, 219-238.
- Sverdrup H and Warfvinge 1988 Weathering of primary silicate minerals in the natural soil environment in relation to a chemical weathering model. *Water Air Soil Poll* 38, 387-408.
- Sverdrup H, Warfvinge P, Rabenhorst M, Janicki A, Morgan R and Bowman M 1992 Critical loads and steady-state chemistry for streams in the state of Maryland. *Environ Pollut* 77, 195-203.
- Swank W T and Douglass J E 1977 Nutrient budgets for undisturbed and manipulated forest ecosystems in the mountains of North Carolina. *Watershed research in eastern North America. A workshop to compare results*, Volume I, February 28-March 3, 1977, 343-364.
- Taiz L and Zeiger E 2010 *Plant Physiology*, 5th Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Teng F Z, Wadhwa M and Helz R T 2007 Investigation of magnesium isotope fractionation during basalt differentiation: Implications for a chondritic composition of the terrestrial mantle. *Earth and Planet Sc Lett* 261, 84-92.

- Thimonier A, Dupouey J L and Le Tacon F 2000 Recent losses of base cations from soils of *Fagus sylvatica* L. stands in northeastern France. *Ambio* 29, 314-321.
- Timmer V R, Savinsky H M and Marek G T 1983 Impact of intensive harvesting on nutrient budgets of boreal forest stands. *Resources and dynamics of the boreal zone*, 131-147.
- Tipper E T, Galy A and Bickle M J 2006a Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planet Sc Lett* 247, 267-279.
- Tipper E T, Galy A and Bickle M J 2008a Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochim Cosmochim* 72, 1057-1075.
- Tipper E T, Galy A, Gaillardet J, Bickle M J, Elderfield H and Carder E A 2006b The magnesium isotope budget of the modern ocean: Constraints from riverine magnesium isotope ratios. *Earth and Planet Sc Lett* 250, 241-253.
- Tipper E T, Louvat P, Capmas F, Galy A and Gaillardet J 2008b Accuracy of stable Mg and Ca isotope data obtained by MC-ICP-MS using the standard addition method. *Chem Geol* 257, 65-75.
- Trettin C C, Johnson D W and Todd D E 1999 Forest nutrient and carbon pools at Walker Branch Watershed: Changes during a 21-year period. *Soil Sci Soc Am J* 63, 1436-1448.
- Turpault M P, Nys C and Calvaruso C 2009 Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma* 153, 147-154.
- Ulrich B 1983 Interaction of forest canopies with atmospheric constituents: SO₂, alkali and earth alkali cations and chloride. In *Effects of accumulation of air pollutants in forest ecosystems*. Eds. B Ulrich and J Pankrath. pp 33-45. D Reidel, Boston.
- van der Heijden G, Legout A, Nicolas M, Ulrich E, Johnson D W and Dambrine E 2011 Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change. *Forest Ecol Manag* 261, 730-740.
- Verstraeten A, Neiryck J, Genouw G, Cools N, Roskams P and Hens M 2012 Impact of declining atmospheric deposition on forest soil solution chemistry in Flanders, Belgium. *Atmos Environ* 62, 50-63.
- Vries W, Posch M and Kämäri J 1989 Simulation of the long-term soil response to acid deposition in various buffer ranges. *Water, Air, & Soil Pollution* 48, 349-390.
- Vuorenmaa J 2004 Long-term changes of acidifying deposition in Finland (1973-2000). *Environ Pollut* 128, 351-362.
- Wallman P, Svensson M, Sverdrup H and Belyazid S 2005 ForSAFE-an integrated process-oriented forest model for long-term sustainability assessments. *Forest Ecol Manag* 207, 19-36.
- Warby R A F, Johnson C E and Driscoll C T 2007 Continuing acidification of organic soils across the northeastern USA: 1984-2001. *Soil Sci Soc Am J* 73, 274-284.
- Warfvinge P, Kreutzer K, Rothe A and Walse W 1998 Modeling the effects of acid deposition on the biogeochemistry of the Hoeglwald spruce stand, FRG. *Forest Ecol Manag* 101, 319-330.
- Warfvinge P and Sverdrup H 1992 Calculating critical loads of acid deposition with PROFILE - a steady-state soil chemistry model. *Water Air Soil Poll* 63, 119-143.
- Watmough S A, Aherne J, Alewell C, Arp P, Bailey S, Clair T, Dillon P, Duchesne L, Eimers C, Fernandez I, Foster N, Larssen T, Miller E, Mitchell M and Page S 2005 Sulphate, nitrogen and base cation budgets at 21 forested catchments in Canada, the United States and Europe. *Environ. Monit. Assess.* 109, 1-36.
- Watmough S A and Dillon P J 2003 Base cation and nitrogen budgets for a mixed hardwood catchment in South-Central Ontario. *Ecosystems* 6, 675-693.
- Weatherall A, Proe M F, Craig J, Cameron A D, McKay H M and Midwood A J 2006a Tracing N, K, Mg and Ca released from decomposing biomass to new tree growth. Part I: A model system simulating harvest residue decomposition on conventionally harvested clearfell sites. *biomass Bioenerg* 30, 1053-1059.
- Weatherall A, Proe M F, Craig J, Cameron A D, McKay H M and Midwood A J 2006b Tracing N, K, Mg and Ca released from decomposing biomass to new tree growth. Part II: A model system simulating root decomposition on clearfell sites. *biomass Bioenerg* 30, 1060-1066.
- Weatherall A, Proe M F, Craig J, Cameron A D and Midwood A J 2006c Internal cycling of nitrogen, potassium and magnesium in young Sitka spruce. *Tree Physiol* 26, 673-680.

- White P J and Broadley M R 2003 Calcium in plants. *Annals of Botany* 92, 487-511.
- Wiechert U and Halliday A N 2007 Non-chondritic magnesium and the origins of the inner terrestrial planets. *Earth and Planet Sc Lett* 256, 360-371.
- Wiegand B A, Chadwick O A, Vitousek P M and Wooden J L 2005 Ca cycling and isotopic fluxes in forested ecosystems in Hawaii. *Geophysical research letters* 32.
- Wombacher F, Eisenhauer A, Heuser A and Weyer S 2009 Separation of Mg, Ca and Fe from geological reference materials for stable isotope ratio analyses by MC-ICP-MS and double-spike TIMS. *J Anal Atom Spectrom* 24, 627-636.
- Yanai R D, Battles J J, Richardson A D, Blodgett C A, Wood D M and Rastetter E B 2010 Estimating Uncertainty in Ecosystem Budget Calculations. *Ecosystems* 13, 239-248.
- Young E D and Galy A 2004 The isotope geochemistry and cosmochemistry of magnesium. In *Geochemistry of Non-Traditional Stable Isotopes*. Eds. C M Johnson, B L Beard and F Albarede. pp 197-230. Mineralogical Soc America, Washington.
- Zaccherio M T and Finzi A C 2007 Atmospheric deposition may affect hardwood forest composition by altering soil nutrient supply. *Ecological applications* 17, 1929-1941.
- Zapater M, Hossann C, Breda N, Brechet C, Bonal D and Granier A 2011 Evidence of hydraulic lift in a young beech and oak mixed forest using 0-18 soil water labelling. *Trees-Structure and Function* 25, 885-894.
- Zeller B 1998 Contribution à l'étude de la décomposition d'une litière de hêtre, la libération de l'azote, sa minéralisation et son prélèvement par le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) dans une hêtraie de montagne du bassin versant du Strengbach (Haut-Rhin). p. 146. Université Henri Poincaré, Nancy.
- Zeller B, Colin-Belgrand M, Dambrine E and Martin F 1998 ^{15}N partitioning and production of ^{15}N -labelled litter in beech trees following [^{15}N] urea spray. *Ann For Sci* 55, 375-383.
- Zeller B, Colin-Belgrand M, Dambrine E and Martin F 2000 Decomposition of ^{15}N -labelled beech litter and fate of nitrogen derived from litter in a beech forest. *Oecologia* 123, 550-559.
- Zeller B, Colin-Belgrand M, Dambrine E and Martin F 2001 Fate of nitrogen released from ^{15}N -labelled litter in European beech forests. *Tree Physiol* 21, 153-162.
- Zhu P and Macdougall J D 1998 Calcium isotopes in the marine environment and the oceanic calcium cycle. *Geochim Cosmochim* 62, 1691-1698.



Chapitre II – Matériels et Méthodes

I. Description du site

Le site expérimental de Breuil-Chenue est situé dans le massif montagneux du Morvan, Bourgogne, France (latitude 47°18'10", longitude 4°4'44") à une altitude de 640m. La hauteur de précipitation annuelle est en moyenne de 1180mm, l'évapotranspiration potentielle annuelle est en moyenne de 750mm et la température annuelle moyenne de 9°C (moyennes calculées sur la période 2006-2010). La forêt native est un taillis-sous-futaie vieilli à réserves de hêtre (dominant) (*Fagus sylvatica* L) et de chêne (*Quercus sessiliflora* Smith) et taillis de diverses essences (*Quercus sessiliflora* Smith), *Betula verrucosa* Ehrh., *Corylus avelana* L.), Ces taillis ont été soumis dans le passé à une exploitation parfois importante, en particulier pour le bois de feu.

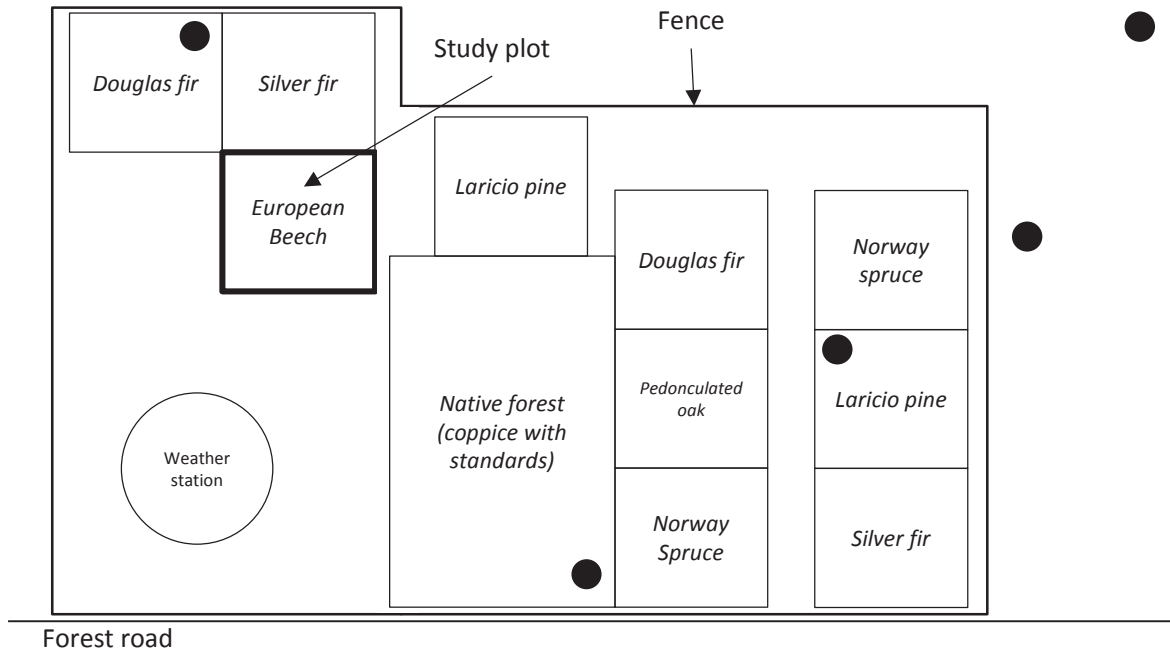
Le sol très acide et désaturé, est de type Alacrisol (Alumic Cambisol; WRB FAO). L'humus est de type moder. Un processus de micropodzolisation de surface est observable à la base de l'humus, (Ranger *et al.*, 2004). Le substrat géologique est un granite leucocrate à gros grains et deux micas de la Pierre-qui-Vire, dont les compositions minéralogique et chimique sont les suivantes : 23,5 % de quartz, 44 % de feldspath K, 28,5 % de plagioclase, 1,6 % de biotite chloritisée et 1,6 % de muscovite (Seddoh, 1973). La minéralogie de ces sols, déterminée par Mareschal (2008) montre que la fraction des argiles (0-2 µm) est constituée d'illite (30%), vermiculite (25%), kaolinite (25%), quartz (10%) et gibbsite (5%). La smectite est présente dans l'horizon superficiel (<5%).

En 1974, huit profils de sol ont été prélevés sur l'ensemble du dispositif avant la coupe et la plantation. Le carbone total et les cations échangeables ont été déterminés (extractions de la CEC du sol avec de l'acétate d'ammonium à 1 mol.L⁻¹). En 1975, le peuplement natif a été coupé à blanc. Avant plantation, un andainage « fort » a été réalisé pour le bloc 1 : tous les rémanents d'exploitation furent retirés de la parcelle, l'humus et une partie de l'horizon A1 furent décapés. Les rémanents furent brûlés dans le bloc 2. La parcelle a ensuite été divisée en placettes de 1000 m² qui ont été plantées avec les espèces suivantes (plantations monospécifiques) : le chêne (*Quercus sessiliflora* Smith), le Hêtre (*Fagus sylvatica* L.), l'épicéa commun (*Picea abies* Karst.), le Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Franco), le sapin de Nordmann (*Abies nordmanniana* Spach.), le pin laricio de Corse (*Pinus nigra* Arn. ssp *laricio* Poiret var *corsicana*). Un plan du site de Breuil-Chenue est donné en Figure II-1.

Horizon	Depth cm	Bulk density Ø<2mm g.kg ⁻¹	C g.kg ⁻¹	C/N	Soil Texture			Soil cationic exchange capacity						
					Sand %	Silt %	Clay %	ECEC cmolc.kg ⁻¹	BS %	Mg cmolc.kg ⁻¹	Ca cmolc.kg ⁻¹	K cmolc.kg ⁻¹	Al cmolc.kg ⁻¹	H cmolc.kg ⁻¹
A1/E	0-5	0.50	72.6	18.0	57.6	21.8	20.6	8.66	19.44	0.23	0.54	0.37	6.30	0.83
A1-A1/Bp	5-10	0.64	46.1	18.1	60.2	21.5	18.4	7.23	10.88	0.13	0.15	0.22	6.05	0.42
Sal 1	10-15	0.67	34.2	18.1	58.0	23.6	18.4	5.43	7.88	0.08	0.07	0.14	4.85	0.18
Sal 2	15-25	0.89	23.3	17.9	60.0	24.1	16.0	4.08	5.75	0.04	0.02	0.10	3.79	0.12
Sal 2	25-40	0.90	14.0	17.1	57.8	24.7	17.5	3.13	7.38	0.03	0.02	0.08	2.73	0.09
Sal 3	40-55	1.08			55.7	25.8	18.5	3.11	8.06	0.02	0.01	0.09	2.62	0.08
II Sal 4	55-70	1.05			57.3	25.3	17.5	3.32	8.06	0.03	0.02	0.09	2.80	0.10

Table II-1 : Description des propriétés physico-chimiques du sol de la placette de hêtre du site expérimental de Breuil-Chenue

Bloc 1



Bloc 2

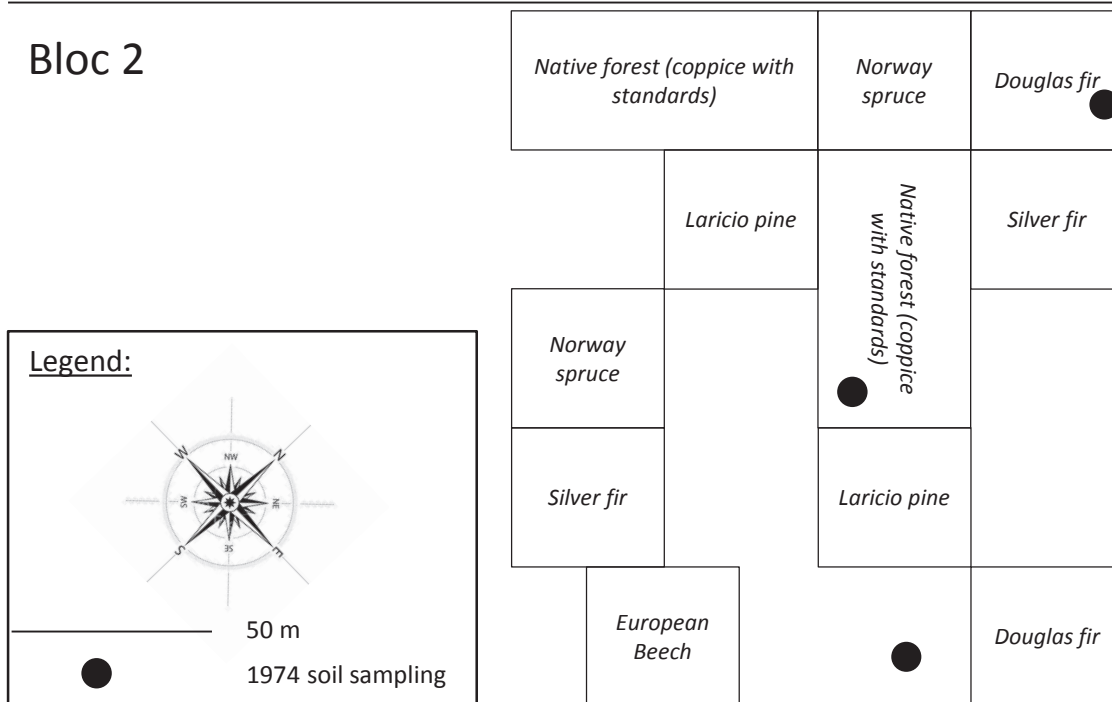


Figure II-1 : Plan du site expérimental de Breuil-Chenu

Dans la présente étude, nous nous focaliserons sur la placette de Hêtre (*Fagus sylvatica* L.). Dans ce peuplement, l'humus est de type mesomull : la couche OL est peu épaisse (0.5 à 1cm) et repose sur une très fine et discontinue couche OF (Moukoui, 2006). Cette faible épaisseur est clairement liée à la jeunesse du peuplement, et au décapage avant plantation. En 2001, 16 profils de sol (0-70cm) ont été prélevés. Les propriétés physico-chimiques du sol sont décrites dans le Tab II-1.

Nous avons sélectionné pour notre étude le site de Breuil et la placette de hêtre pour les raisons suivantes :

- très faibles stocks échangeables de Ca et Mg dans les sols (coûts réduits de marquage) (Table II-2);
- bonne connaissance de la placette grâce à des travaux antérieurs ((Ranger *et al.*, 2004; Jaffrain, 2006; Levrel and Ranger, 2006; Moukoumi, 2006; Sicard *et al.*, 2006; Mareschal, 2008; Andrianarisoa, 2009)
- placette fortement instrumentée avec une solide base de données existante (10 ans de données météo, TDR, sols, solutions...).

Site Name	Tree species	Tree age Years	Exchangeable cation pools (kg.ha ⁻¹)			References
			Mg	Ca	K	
Gemaingoutte	<i>Picea abies</i>	85	117.0	359.3	290.1	(Mohamed, 1992)
Fougères	<i>Fagus silvatica</i>	25	105.0	151.4	266.6	(Legout, 2008; Legout <i>et al.</i> , 2008)
Vauxrenard	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	40	62.1	366.0	477.6	(Ranger <i>et al.</i> , 1995; Marques, 1996)
Aubure	<i>Picea abies</i>	30	52.1	241.2	775.6	(Mohamed <i>et al.</i> , 1993; Ranger <i>et al.</i> , 1993; Poszwa <i>et al.</i> , 2000)
Ardennes	<i>Quercus petraea</i>		51.0	228.3	173.9	(Nys <i>et al.</i> , 1983; Nys, 1987; Nys and Ranger, 1988)
Breuil	<i>Fagus silvatica</i>	25	32.6	60.6	264.8	Present study
Bonhomme	<i>Picea abies</i>	70	28.1	121.6	246.4	(Mohamed, 1992; Mohamed <i>et al.</i> , 1993)
Kondi**	<i>Eucalyptus</i>	6	27.9	86.8	83.0	(Laclau, 2001; Laclau <i>et al.</i> , 2010)
SP-57	<i>Abies alba</i>	54	26.2	120.0	121.0	(van der Heijden <i>et al.</i> , 2011)
Itatinga*	<i>Eucalyptus</i>	6	14.6	10.2	14.4	(Maquère, 2008; Laclau <i>et al.</i> , 2010)

Table II-2: Comparaison des réserves de Mg, Ca et K échangeables du sol de différents sites expérimentaux de l'unité INRA-BEF (1138) en climat tempéré (France) et tropical (Brésil, République démocratique du Congo).

II. Installations permanentes

Le site expérimental de Breuil-Chenua a été instrumenté en 2000.

Une station météorologique (figure 1) enregistre au pas de temps semi-horaire les hauteurs de précipitations (mm), l'humidité de l'air (%), la température (°C), le rayonnement (W.m⁻²) et la vitesse du vent (m.s⁻¹) au-dessus de la canopée forestière (station équipée d'une antenne de 15m). La pluie hors-couvert est collectée à la station météorologique et avec un sceau en PEHD dans une clairière à environ 500m du site expérimental.

La placette expérimentale de hêtre (figure 2) est équipée pour collecter les solutions sous-couverts et les solutions du sol. La pluie sous couvert (pluiolessivats) est collectée par quatre gouttières (deux mètres de long en PEHD) couvrant ainsi une surface totale de 1.55m². Les écoulements de tronc sont collectés sur cinq arbres représentatifs des différentes classes de circonférences présentes sur la placette. Les solutions gravitaires du sol sont collectées avec des lysimètres sans tension insérés entre l'humus et le premier horizon organo-minéral (profondeur 0 cm) et à 10 cm de profondeur (trois répétitions par profondeur). D'autre part, les solutions liées du sol sont collectées avec des bougies poreuses (TCL; Oikos Umweltanalytik GBR, Ceramic P80, porosity 45 µm, alumina-silica, vide appliqué 0.6 bars) à trois profondeurs 15, 30 et 60 cm de profondeur (4 répétitions par profondeur).

III. Expérience de multi-traçage isotopique

En 2009, une zone d'exclusion racinaire a été mise en place en insérant des plaques de PVC verticalement dans les 40 premiers centimètres sol, délimitant ainsi le périmètre de la zone de traçage (surface 76m^2) (appelée placette traçage n°1). Une seconde placette de 4m^2 (appelée placette traçage n°2) dédiées aux prélèvements destructifs (humus, sols) a été mise en place à 15 mètres de la première (Figure II-2).

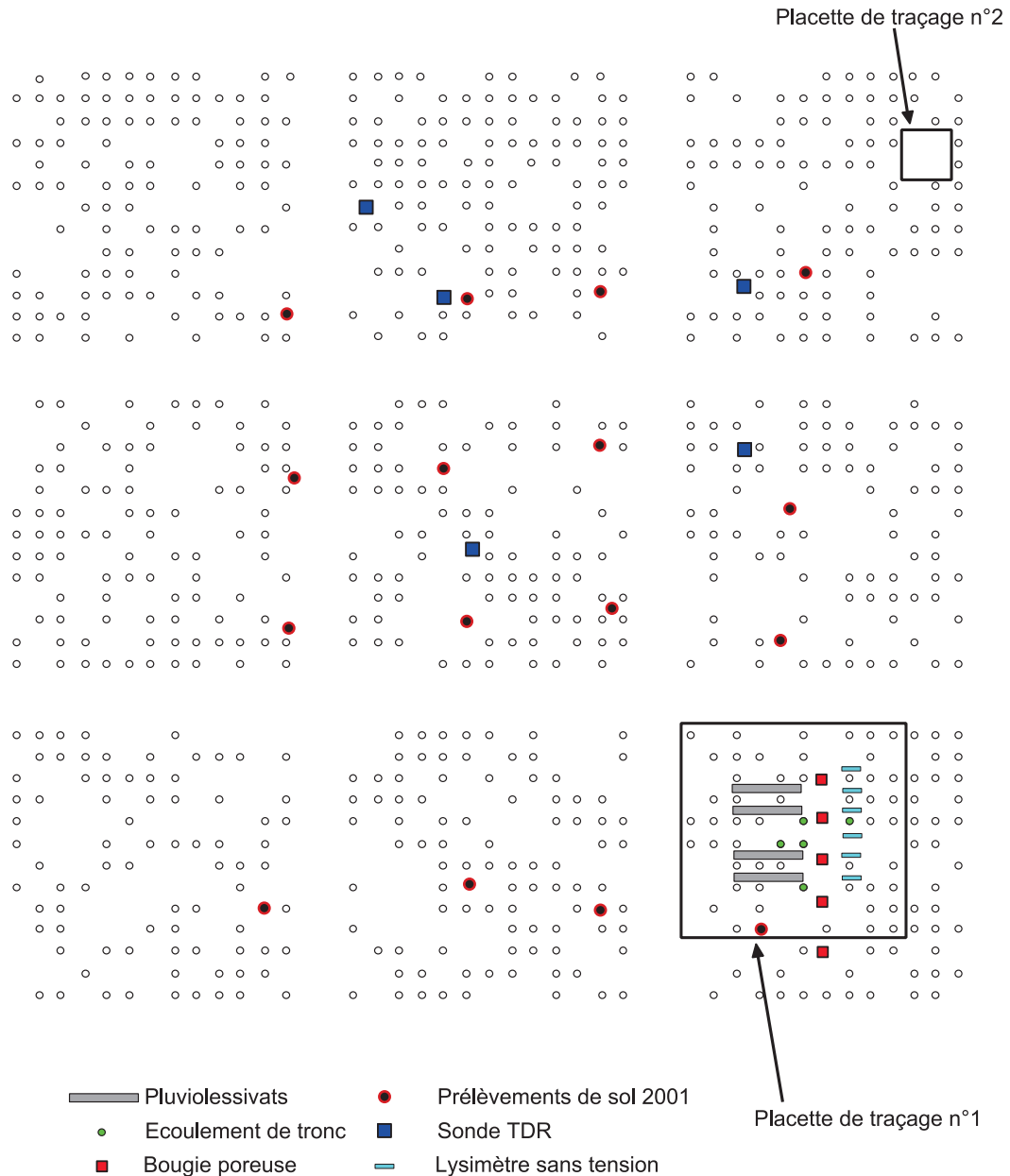


Figure II-2 : Plan des équipements de suivi dans la placette de hêtre de Breuil-Chenu



Figure II-3 : Expérience de traçage multi-isotopique sur la placette de hêtre du site expérimental de Breuil-Chenu. (1) Quadrillage de maille 1m² de la zone de 80m² pour pulvériser au sol le traceur de manière homogène, (2) Bâche protectrice autour de la zone de 80m² pour éviter de contaminer les placettes voisines, (3) pulvérisation de la solution de traçage, (4) apport d'une lame d'eau déminéralisée, (5) la zone de 80m² entourée d'un filet pour récupérer la chute de litière de l'automne 2010, (6) les arbres de la placette ont été emballés individuellement dans un filet pour récupérer la chute de litière de l'automne 2011.

8000 mg de N sous forme KNO₃ enrichi en ¹⁵N (99 atom%), 7679.5mg de Mg sous forme MgO enrichi en ²⁶Mg (99.25 atom%) et 4226.1mg de Ca sous forme CaCO₃ enrichi en ⁴⁴Ca (96.45 atom%) ont été dissous dans 15 L d'eau déminéralisée et 5L d'eau enrichi en deutérium (99.85 atom%). En avril 2010, la solution de traçage (20 L), dont la composition chimique et isotopique est décrite dans le Table II-3, a été pulvérisée sur les 2 placettes de traçage représentant une lame d'eau de 0.25 mm (Figure II-3.3). Les deux placettes avaient été préalablement quadrillées (maillage 1m²) pour faciliter une pulvérisation homogène de la solution de traçage (Figure II-

3.1). Une lame d'eau déminéralisée de 16 mm a ensuite été apportée sur une période de 8h de manière à simuler un épisode pluvieux naturel (intensité env. 2mm/h). L'objectif était d'éviter une forte perte de deutérium par évaporation dans les premiers jours après l'expérience de traçage. Les traceurs ^{15}N , ^{26}Mg et ^{44}Ca ainsi appliqués au sol permettent de tracer le nitrate, le magnésium et le calcium apportés par la pluie.

Les chutes de litière à la fin de chaque saison de végétation ont été collectées pour éviter un second apport de traceurs au sol. En 2010, la placette de traçage a été entourée par un filet (Figure II-3.5). En 2011, les arbres de la placette ont été emballés dans des filets (Figure II-3.6). Ces feuilles ont été remplacées par une quantité équivalente de feuilles de hêtre non marquées, étalée sur le sol au début de chaque hiver suivant l'emballage. L'objectif était d'éviter un éventuel second pulse de traceur à la surface du sol.

IV. Suivi, échantillonnages réalisés et méthodes analytiques

Un schéma récapitulatif des différents suivis, échantillonnages, opérations sylvicoles et méthodes analytiques est présenté dans la Figure

IV.1. Echantillonnage des pluies, pluvioléssivats, écoulements de tronc et solutions de sol

Pour suivre les transferts rapides des traceurs isotopiques, les solutions du sol ont initialement été prélevées toutes les 2h puis le pas de temps a été progressivement augmenté (6h, 24h, 7 jours, 14 jours et 28 jours) au cours du premier mois suivant l'apport de la solution de traçage. Les pluies, écoulements de tronc et pluvioléssivats ont également été prélevées au même pas de temps de 28 jours. Toutes les solutions collectées ont été ensuite stockées dans des piluliers en polypropylène à 4°C. Pour éviter des phénomènes de fractionnement isotopique par évaporation, les échantillons de solution pour l'analyse de la composition isotopique d'hydrogène ($^2\text{H}/^1\text{H}$) ont été filtrés sur le terrain (0.2 μm) et stockés dans des piluliers en verre (2mL) avec des capuchons en PTFE.

	Concentration	Flux	Composition isotopique	
	meq.L ⁻¹	kg.ha ⁻¹	%	δ (‰)
NO ₃ ⁻ (^{15}N)	26.7	1	99	2.69E+07
Ca ²⁺ (^{44}Ca)	9.6	0.53	96.45	1.26E+06
Mg ²⁺ (^{26}Mg)	29.6	0.96	99.25	1.09E+06
H ₂ O (^2H)	-	-	24.97	2.14E+06

Table II-3 : Compositions chimique et isotopique de la solution de traçage apportée à la placette de traçage en avril 2010. La composition isotopique de la solution de traçage est exprimée en pourcentage atomique et en $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{26}\text{Mg}$, $\delta^{44}\text{Ca}$ ou $\delta^2\text{H}$.

IV.2. Echantillonnage des sols et de l'humus

De manière à préserver la placette de traçage n°1 pour le suivi de l'expérience de multi-traçage sur le long-terme, le sol a été échantillonné dans la placette de traçage n°2 de 4 m². Le sol a été prélevé à l'aide d'une tarière cylindrique (8cm de diamètre et 15cm de hauteur). Les dates d'échantillonnage sont données dans le Tableau 3. Initialement, huit profils de sol ont été prélevés à chaque date d'échantillonnage. Puis à partir de septembre 2011, quatre profils de sol ont été prélevés à chaque date. Pour chaque profil, l'humus a été séparé des horizons organo-minéraux. Le profil de sol a ensuite été divisé en couches de 2.5 cm jusqu'à 10 cm de profondeur puis en couche de 5 cm d'épaisseur au-delà de cette profondeur.

Les échantillons de sol humides ont été tamisés à 4mm et les racines fines ont été prélevées et regroupées par profondeur. Les échantillons de racines fines et d'humus ont été séchés à l'étuve (65°C). Les racines fines ont ensuite été nettoyées dans une solution d'acétate d'ammonium à 1M. L'objectif était double : débarrasser les racines du sol rhizosphérique et extraire les cations adsorbés à la surface des racines. Les racines ont ensuite été rincées à l'eau déminéralisée avant d'être à nouveau séchées à l'étuve 65°C. Les racines fines et les échantillons d'humus ont finalement été broyés puis minéralisés avec de l'acide nitrique (50%).

Des extractions de sol ont été réalisées sur les échantillons de sol de manière à caractériser la composition isotopique du Mg et Ca présents sur la CEC et dans la biomasse microbienne du sol. Les cations échangeables ont été extraits par deux extractions successives : 7.5g de sol humide ont été agités dans 50mL d'une solution d'acétate d'ammonium (1 mol.L⁻¹) pendant 1 h. Après centrifugation (3000tr.min⁻¹ pendant 10min), le surnageant des deux extractions successives était récupéré et mélangé. Les cations immobilisés dans la biomasse microbienne ont été extraits en utilisant le protocole de fumigation au chloroforme : 7.5g de sol humide ont été pesés dans des cristallisoirs en verre et fumigés au chloroforme pendant 24h. Les échantillons fumigés ont ensuite été extraits selon le protocole décrit ci-dessus. Le taux d'humidité du sol lors de l'extraction a été mesuré et l'immobilisation microbienne a été estimée pour les échantillons de sol de la couche 0-30cm de profondeur à partir de la différence entre l'extraction « fumigé » et l'extraction « non-fumigé ».

IV.3. Echantillonnage de la biomasse végétale

Au cours de la première saison de végétation (de mai à novembre) après l'apport de la solution de traçage (2010), trois branches de trois arbres différents ont été prélevées au pas de temps de 28 jours. La saison de végétation suivante (2011), cinq branches de cinq arbres différents ont été prélevées au pas de temps de 28 jours. Les feuilles vertes ont été séparées de la partie ligneuse de chaque branche. Les échantillons (feuilles et branches) ont été séchés à l'étuve (65°C), broyés puis minéralisés avec de l'acide nitrique (50%). Comme décrit précédemment, la chute de litière a été récoltée en 2011 et en 2012.

En février 2012, six arbres ont été abattus dans la placette de traçage n°1, dans le cadre d'une éclaircie. La localisation des arbres échantillons dans la placette de traçage n°1 est donnée dans la Figure II-4. Les différents organes du houppier des arbres échantillons ont été compartimentés selon leur hauteur dans le houppier (tiers supérieur, tiers médian, tiers inférieur et branches gourmandes) et selon le diamètre des branches (inférieure à 1cm, entre 1

et 2 cm, entre 2 et 4 cm). Le bois et l'écorce ont été séparés pour les branches de diamètre supérieur à 1 cm. Un schéma descriptif du protocole d'échantillonnage est donné dans la Figure II-5.

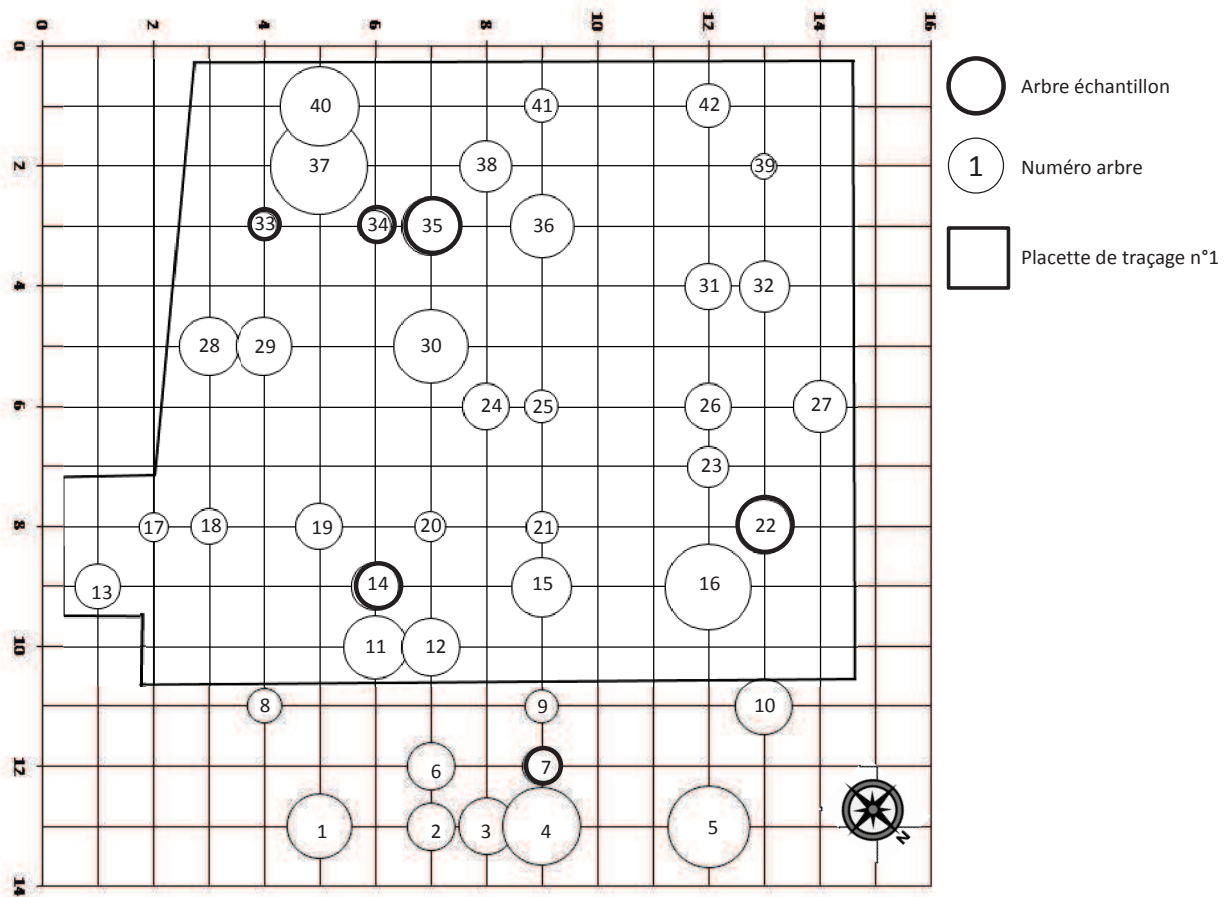


Figure II-5 : Plan de la placette de traçage n°1 et localisation des arbres échantillonnés pour mesurer la quantité de ^{26}Mg et ^{44}Ca prélevée au cours des deux ans après l'apport des traceurs isotopiques. Les arbres sont représentés par les disques blanc numérotés, la taille des disques représente la circonférence relative des arbres.

Des rondelles ont été prélevées dans le tronc de chaque arbre échantillon à différentes hauteurs : souche, 50cm, 1m, 1.3m, 2m, puis tous les mètres). Pour chaque rondelle, l'écorce a été séparée et, lorsque le diamètre de la rondelle le permettait, le bois a été séparé en trois compartiments selon la distance à l'écorce: 0-5 mm, 5-15 mm et >15mm.

Chaque compartiment (branches et billons de tronc) a été pesé humide le jour de l'éclaircie. Des échantillons de chaque compartiment ont été prélevés pour estimer le taux d'humidité (séchage à l'étuve, 65°C). Des échantillons de chaque compartiment ont également été prélevés, séchés à l'étuve (65°C), broyés puis minéralisés à l'acide nitrique (50%) pour mesurer la composition chimique et isotopique.

IV.4. Analyse de la composition chimique et isotopique des échantillons

La composition chimique des éléments majeurs dans les solutions (Al, Ca, Mg, K), les extractions de sol, les humus et les échantillons de biomasse végétale (Ca, Mg et K) a été analysée par ICP-AES (Jobin-Yvon Ultrace 180). Les concentrations en nitrate, ammonium et chlorure dans les solutions ont été analysées par spectrométrie d'absorption moléculaire

(SKALAR). Le carbone total et l'azote total en solution a été déterminée par absorption infrarouge du CO_2 dégagé après combustion (SHIMADZU®, TOC-5050).

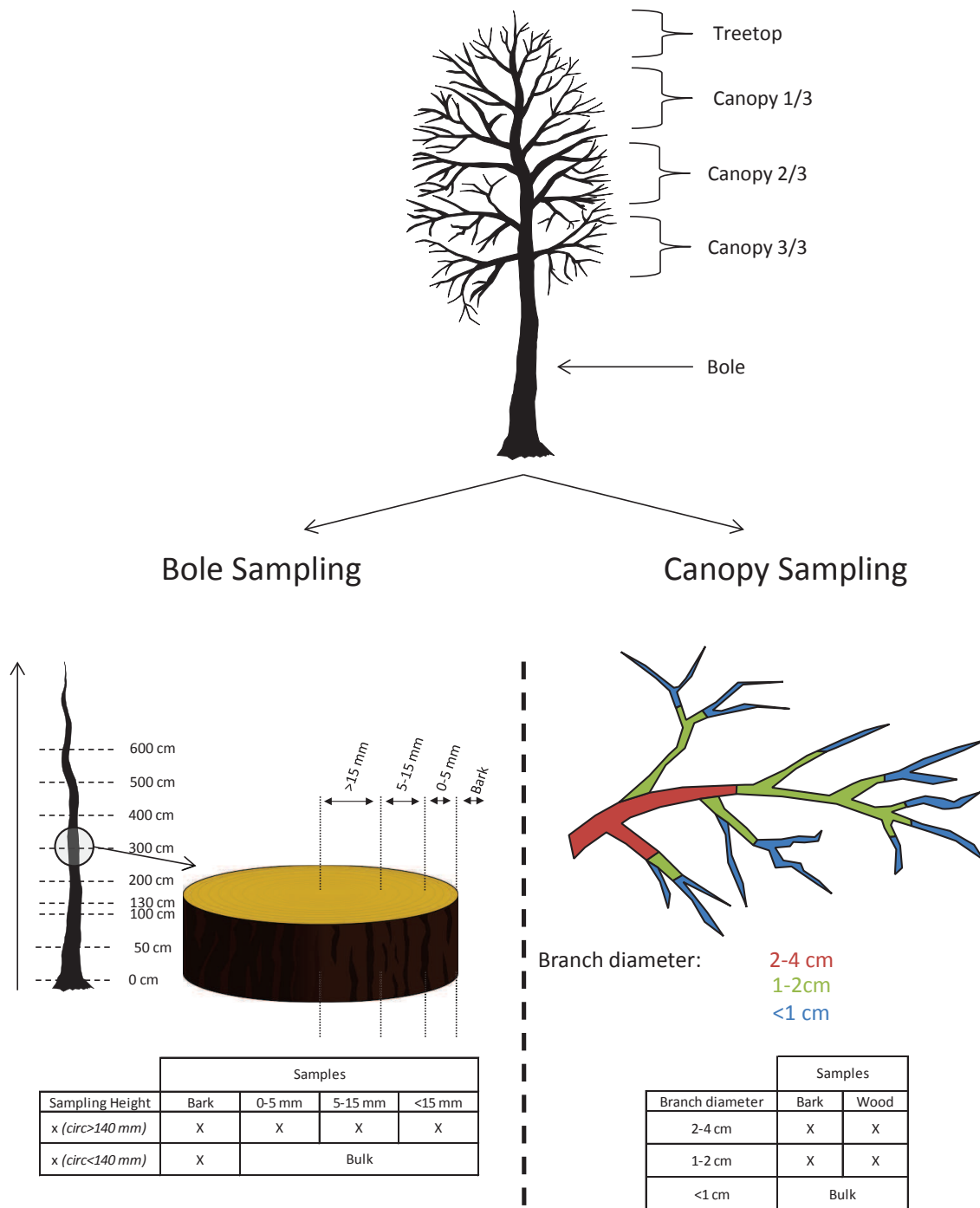


Figure II-6 : Schéma récapitulatif du protocole d'échantillonnage des arbres abattus lors de l'éclaircie en 2012.

Les rapports isotopiques $^2\text{H}/^1\text{H}$ ont été mesuré par IRMS (GV Instruments, Isoprime). Les rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ ont été mesuré par ICP-MS (Bruker 820MS). Le

développement méthodologique des analyses isotopiques par ICP-MS est détaillé dans le chapitre V de ce mémoire. Seule une brève description du protocole est donnée ici.

Avant analyse, la concentration en Mg et en Ca de chaque échantillon a été ajustée à 100ppb de Mg ou Ca. Des standards de composition isotopique connue ont été analysés tous les 10 échantillons pour suivre la dérive temporelle et corriger le fractionnement instrumental (« standard bracketing technique »). Le fractionnement instrumental a été corrigé avec un seul standard pour $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ (NIST-SRM-980) et avec deux standards pour $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ (NIST-SRM-915b et un standard enrichi établi à l'INRA-BEF). L'acétate d'ammonium à fortes concentrations est une source d'interférences spectrales pour la mesure des rapports isotopiques du Mg. L'acétate d'ammonium des extractions de sol (1 mol.L⁻¹) a été minéralisé avec de l'eau oxygénée (appliquée sur résidu sec).

III.5. Notation des rapports isotopiques et calculs de stocks de traceurs dans les compartiments de l'écosystème

La composition isotopique des échantillons est exprimée soit (1) en valeur absolue du rapport isotopique pour $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ ou $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, (2) soit en pourcentage atomique de ^{26}Mg ou ^{44}Ca , (3) soit en déviation (‰) par rapport à un ratio isotopique de référence (SMOW pour $^2\text{H}/^1\text{H}$, DSM3 pour $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ (Galy *et al.*, 2003) et NIST-915b pour $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) :

$$\delta^2H = \left\{ \left(\frac{^2H}{^1H} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^2H}{^1H} \right)_{\text{SMOW}} - 1 \right\} \times 1000 \quad \text{Equation (1)}$$

$$\delta^{26}\text{Mg} = \left\{ \left(\frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3}} - 1 \right\} \times 1000 \quad \text{Equation (2)}$$

$$\delta^{44}\text{Ca} = \left\{ \left(\frac{^{44}\text{Ca}}{^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{44}\text{Ca}}{^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{NIST915a}} - 1 \right\} \times 1000 \quad \text{Equation (3)}$$

Pour estimer la quantité de ^{26}Mg et ^{44}Ca dans chaque compartiment de l'écosystème liée à l'apport de la solution de traçage, il est nécessaire de distinguer la part de ^{26}Mg et ^{44}Ca présent naturellement et l'enrichissement lié à l'expérience de traçage. L'excès de ^{26}Mg et ^{44}Ca dans un compartiment donné de l'écosystème a été estimé en supposant que la composition isotopique naturelle (composition isotopique « témoin ») était égale de 0‰ pour $\delta^{26}\text{Mg}$ et $\delta^{44}\text{Ca}$:

$$\text{excess}(^yX)_{\text{echt}} = [X]_{\text{echt}} \times (\% ^yX_{\text{echt}} - \% ^yX_{\text{nat}}) \quad \text{Equation (4)}$$

Où $\text{excess}(^yX)$ est l'excès de traceur isotopique (^{26}Mg ou ^{44}Ca) lié à l'apport de la solution de traçage dans l'échantillon ou le compartiment, $[X]_{\text{echt}}$ la concentration ou stock en élément total X (Mg ou Ca) dans l'échantillon ou le compartiment, $\% ^yX_{\text{echt}}$ la concentration en traceur isotopique (^{26}Mg ou ^{44}Ca) dans l'échantillon ou le compartiment exprimée en pourcentage atomique de l'élément total et $\% ^yX_{\text{nat}}$ la concentration en traceur isotopique (^{26}Mg ou ^{44}Ca) à l'abondance naturelle exprimée en pourcentage atomique de l'élément total (11.005% ^{26}Mg et 2.058% ^{44}Ca). L'excès de ^{26}Mg et de ^{44}Ca est exprimé en mol.ha⁻¹ ou en pourcentage du traceur appliqué.

La concentration en traceur isotopique (^{26}Mg ou ^{44}Ca) dans l'échantillon ou le compartiment est calculée de la manière suivante :

$$\% ^{26}Mg = \frac{(^{26}Mg/^{24}Mg)_m}{1 + (^{25}Mg/^{24}Mg)_{nat} + (^{26}Mg/^{24}Mg)_m} \quad \text{Equation (5)}$$

$$\% ^{44}Ca = \frac{(^{44}Ca/^{40}Ca)_m}{1 + (^{42}Ca/^{40}Ca)_{nat} + (^{43}Ca/^{40}Ca)_{nat} + (^{44}Ca/^{40}Ca)_m + (^{46}Ca/^{40}Ca)_{nat} + (^{48}Ca/^{40}Ca)_{nat}} \quad \text{Equation (6)}$$

où $(^{26}Mg/^{24}Mg)_m$ et $(^{44}Ca/^{40}Ca)_m$ sont les rapports isotopiques mesurés, $(^{25}Mg/^{24}Mg)_{nat}$, $(^{42}Ca/^{40}Ca)_{nat}$, $(^{43}Ca/^{40}Ca)_{nat}$, $(^{46}Ca/^{40}Ca)_{nat}$ and $(^{48}Ca/^{40}Ca)_{nat}$ sont supposés constants et égaux aux valeurs terrestres : 0.1266 pour $^{25}Mg/^{24}Mg$, 6.677×10^{-3} pour $^{42}Ca/^{40}Ca$, 1.3926×10^{-3} pour $^{43}Ca/^{40}Ca$, 4.1262×10^{-5} pour $^{46}Ca/^{40}Ca$ et 1.929×10^{-3} pour $^{48}Ca/^{40}Ca$ (Hoefs, 2009). Ainsi Equation (5) et Equation (6) peuvent être simplifiées :

$$\% ^{26}Mg = \frac{(^{26}Mg/^{24}Mg)_m}{1.1266 + (^{26}Mg/^{24}Mg)_m} \quad \text{Equation (7)}$$

$$\% ^{44}Ca = \frac{(^{44}Ca/^{40}Ca)_m}{1.01003703 + (^{44}Ca/^{40}Ca)_m} \quad \text{Equation (8)}$$

Reference List

- Andrianarisoa, K.S., 2009. Minéralisation de l'azote et nitrification dans les écosystèmes forestiers : effet du type de sol et de l'essence forestière. *Ressources Procédés Produits Environnement*, Université Henri Poincaré, Nancy, 253
- Galy, A., Yoffe, O., Janney, P.E., Williams, R.W., Cloquet, C., Alard, O., Halicz, L., Wadhwa, M., Hutcheon, I.D., Ramon, E., Carignan, J., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM980 and new reference materials for magnesium-isotope-ratio measurements. *J Anal Atom Spectrom* 18, 1352-1356.
- Hoefs, J., 2009. *Stable Isotope Geochemistry*, 6th Edition. Springer-Verlag, Germany.
- Jaffrain, J., 2006. Effet des essences forestières sur le fonctionnement organo-minéral d'un sol acide : observations et modélisations. *Ressources Procédés Produits Environnement*, Université Henri Poincaré, Nancy, France, 355
- Laclau, J.-P., Ranger, J., de Moraes Goncalves, J.L., Maquere, V., Krusche, A.V., M'Bou, A.T., Nouvellon, Y., Saint-Andre, L., Bouillet, J.-P., Piccolo, M.d.C., Deleporte, P., 2010. Biogeochemical cycles of nutrients in tropical Eucalyptus plantations Main features shown by intensive monitoring in Congo and Brazil. *Forest Ecol Manag* 259, 1771-1785.
- Laclau, J.P., 2001. Dynamique du fonctionnement minéral d'une plantation d'eucalyptus. Effets du reboisement sur un sol de savane du littoral congolais; conséquences pour la gestion des plantations industrielles. *Institut National Agronomique Paris-Grignon*, Paris, 148
- Legout, A., 2008. Cycles Biogéochimiques et bilans de fertilité minérale en hêtraies de plaine. *AGROPARISTECH-ENGREF*, Nancy, 281
- Legout, A., Walter, C., Nys, C., 2008. Spatial variability of nutrient stocks in the humus and soils of a forest massif (Fougeres, France). *Ann For Sci* 65.
- Levrel, G., Ranger, J., 2006. Effet des substitutions d'essences forestières et des amendements sur les propriétés physiques d'un Alocrisol, site expérimental de la forêt de Breuil-Chenué, Morvan, France. *Etude et Gestion des Sols* 13, 71-88.
- Maquère, V., 2008. Dynamics of minrale elements under a fast-growing Eucalyptus plantation in Brazil. Implication for soil sustainability. *AgroParisTech*, Paris, 369
- Mareschal, L., 2008. Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur minéralogie : bilan après 28 ans dans le site expérimental de Breuil (Morvan). *Ressources Procédés Produits Environnement*, Université Henri Poincaré, Nancy, 328
- Marques, R., 1996. Dynamique du fonctionnement minéral d'une plantation de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (mirb) Franco.) dans les monts du beaujolais (France). *ENGREF*, Nancy, 240
- Mohamed, A.D., 1992. Rôle du facteur édaphique dans le fonctionnement biogéochimique et l'état de santé de deux pessières vosgiennes. Effet d'un amendement calco-magnésien. Université Henri Poincaré, Nancy, 206
- Mohamed, A.D., Ranger, J., Dambrine, E., Bonneau, M., Gelhaye, D., Granier, A., 1993. The effects of limestone and of limestone plus nPK fertilization on the soil and mass-balance of a spruce stand (*Pices abies* (L) Karst) in the Vosges Mountains. *Forest Ecol Manag* 60, 291-310.
- Moukoui, J., 2006. Effet des essences forestières sur la biodégradation des matières organiques : impacts sur la dynamique et le cycle du carbone, de l'azote et des éléments minéraux. Université Henri Poincaré, Nancy, 255
- Nys, C., 1987. Fonctionnement du sol d'un écosystème forestier. Etude des modifications dues à la substitution d'une plantation d'épicéa commun (*Picea abies*) à une forêt feuillue mélangée des Ardennes. Université Henri Poincaré, Nancy, 207
- Nys, C., Ranger, D., Ranger, J., 1983. Comparative study of two forests ecosystems in French primary Ardennes 3. Bioelements content and biological cycle. *Ann. Sci. For.* 40, 41-66.
- Nys, C., Ranger, J., 1988. The consequence of the substitution of tree species on the biogeochemical mechanism of a forest ecosystem - the sulfure cycle. *Ann. Sci. For.* 45, 169-188.

- Poszwa, A., Dambrine, E., Pollier, B., Atteia, O., 2000. A comparison between Ca and Sr cycling in forest ecosystems. *Plant Soil* 225, 299-310.
- Ranger, J., Andreux, F., Bienaimé, S., Berthelin, J., Bonnaud, P., Boudot, J.P., Bréchet C, Buée, M., Calmet, J., Chaussod, R., Gelhaye, D., Gelhaye, L., Gérard, F., Jaffrain, J., Lejon, D., Le Tacon, F., Lévêque, J., Maurice, J., Merlet, D., Moukoui, J., Munier-Lamy, C., Nourrisson, G., Pollier, B., Ranjard, L., Simonsson, M., Turpault, M.P., Vairalles, D., Zeller, B., 2004. Effet des substitutions d'essence sur le fonctionnement organo-minéral de l'écosystème forestier, sur les communautés microbiennes et sur la diversité des communautés fongiques mycorhiziennes et saprophytes (cas du dispositif de Breuil - Morvan), Rapport final contrat INRA-GIP Ecofor 2001-24, No. INRA 1502A. INRA Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (UR 1138), 54280 Champenoux,
- Ranger, J., Discours, D., Mohamed, A.D., Moares, C., Dambrine, E., Merlet, D., Rouiller, J., 1993. Comparison of the gravitational and the capillary water of three spruce (*Picea abies* Karst) stands in the Vosges - Usefulness for the identification of the current soil function and consequences for the health status of the stands. *Ann. Sci. For.* 50, 425-444.
- Ranger, J., Marques, R., Colinbelgrand, M., Flammang, N., Gelhaye, D., 1995. The dynamics of biomass and nutrient accumulation in a Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Franco.) stand studied using a chronosequence approach. *Forest Ecol Manag* 72, 167-183.
- Seddoh, F.K., 1973. Altération des roches cristallines du Morvan. Etude minéralogique, géochimique et micromorphologique. Université de Dijon, Dijon, 376
- Sicard, C., Saint-Andre, L., Gelhaye, D., Ranger, J., 2006. Effect of initial fertilisation on biomass and nutrient content of Norway spruce and Douglas-fir plantations at the same site. *Trees-Structure and Function* 20, 229-246.
- van der Heijden, G., Legout, A., Nicolas, M., Ulrich, E., Johnson, D.W., Dambrine, E., 2011. Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change. *Forest Ecol Manag* 261, 730-740.



III



Chapitre III – Traçage et modélisation du cycle de l'eau

Une étape préliminaire au calcul des flux d'éléments minéraux et de bilans de flux « entrées-sorties » est l'étude des flux d'eau dans l'écosystème forestier. Ce chapitre présente les processus hydriques dans le peuplement de hêtre étudiés en s'appuyant sur une expérience de traçage isotopique de l'eau (^2H). Nous avons ainsi pu modéliser les flux d'eau et du traceur isotopique dans le sol de la placette expérimentale.

I. Résumé de l'étude

I.1. Introduction

Dans les écosystèmes forestiers, les flux d'éléments minéraux sont en grande partie dépendant des flux d'eau : pluviolessivats, écoulements de tronc et drainage d'eau dans le profil de sol. La connaissance de ces flux d'eau est donc capitale pour calculer les flux de nutriments dans l'écosystème. Alors que certains flux d'eau (par exemple la pluie hors couvert ou sous couvert) sont quantifiables par des méthodes directes, la mesure du flux de drainage en eau à différentes profondeurs du sol est virtuellement impossible. Ce flux est donc généralement estimé à l'aide d'un modèle hydrique qui prédit le flux de drainage à partir de données « entrées » (hauteur des précipitations, évapotranspiration potentielle) et de paramètres caractérisant le sol. Il existe de nombreux modèles hydriques couvrant une large gamme de complexité allant de modèles simples à réservoirs et à flux aux modèles mécanistiques basés sur l'équation de Richards (écoulements en milieu non-saturé). De manière courante, le modèle est calibré sur un jeu de données de mesures de l'humidité volumique du sol (TDR ou échantillonnage du sol) ou sur un jeu de données de mesures de potentiel hydrique du sol (tensiomètres). Cependant, ces calibrations ne sont que rarement validées par des expériences de traçage de l'eau.

L'objectif de cette étude était d'estimer les flux de drainage d'eau dans le profil de sol du peuplement de hêtre. Pour ce faire, deux modèles hydriques de structures différentes (BILJOU et HYDRUS-1D) ont été calibrés en s'appuyant sur le jeu de données de mesures de l'humidité volumique du sol (TDR). La capacité des modèles à reproduire l'élution du deutérium dans le profil de sol a ensuite été testée pour valider la calibration des modèles. L'expérience de traçage au ^2H permet également d'acquérir de nombreux paramètres (temps de résidence de l'eau dans le sol, porosité « efficace » aux transferts...) essentiel pour comprendre le fonctionnement hydrique et les flux d'éléments minéraux.

I.2. Principaux résultats

I.3.1. Mise en évidence de flux préférentiels d'eau dans le sol

L'élution du traceur (enrichissement isotopique $\delta^2\text{H}$) résultant du transfert matriciel de la lame d'eau enrichie a été suivie dans les solutions du sol aux trois profondeurs 15cm, 30cm et 60cm. Les solutions du sol à ces profondeurs ont été collectées avec des bougies poreuses qui collectent essentiellement l'eau lié du sol ($pF > 2.8$) ou eau « matricielle ». La détermination des pics d'élution a permis de calculer les vitesses de transfert de cette lame d'eau en millimètres parcourus par millimètres de pluie percolée. L'inverse de ces vitesses est une estimation de la porosité utilisée par la lame d'eau enrichie (exprimée en pourcentage du volume de sol total).

A 15cm et à 60cm, les valeurs de porosités estimées étaient anormalement élevées dépassant largement les valeurs de porosité totale du sol communément admises. Ceci implique que le flux d'eau réel qui participe au transfert matriciel de la lame de traçage est plus faible que celui que nous avons considéré (pluie-*etp*) pour nos calculs de vitesse et porosité. Plusieurs hypothèses peuvent être posées pour expliquer ce constat :

- i. Une surestimation de la pluie incidente ou du flux d'eau sous-couvert,

- ii. Une sous-estimation de l'évapotranspiration
- iii. L'existence de flux préférentiels d'eau dans le profil de sol (une part de l'eau percolant dans le sol ne participe pas au transfert de la lame de traçage).

Une surestimation de la pluie incidente ou du flux d'eau sous-couvert ainsi qu'une sous-estimation de l'évapotranspiration de l'ordre de 200 mm.an^{-1} est peu probable (Aussenac, 1972; Granier *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2001). La seule hypothèse plausible pour expliquer la sous-estimation des vitesses de transfert de la lame de traçage est l'existence de flux préférentiels d'eau dans le profil de sol.

Les simulations de transfert de deutérium avec les modèles BILJOU et HYDRUS-1D étaient aussi en accord avec l'hypothèse de flux préférentiels. En effet, les deux modèles fonctionnent avec le modèle de transfert par effet piston et ont initialement simulé un transfert de deutérium beaucoup plus rapide que les vitesses observées. Pour pouvoir correctement simuler le transfert de deutérium dans le profil de sol, il faut réduire la quantité d'eau matricielle participant à l'effet piston. La quantité d'eau restant à drainer est alors considérée comme des écoulements préférentiels qui ne participent pas au transfert matriciel de traceur tel qu'observé par l'intermédiaire des bougies poreuses.

I.3.2. Quantification des flux préférentiels d'eau dans le sol

De nombreuses études ont montré l'importance des flux préférentiels dans le fonctionnement hydrique des sols (Feyen *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2003; Deeks *et al.*, 2008; Allaire *et al.*, 2009; Legout *et al.*, 2009; Stumpp and Maloszewski, 2010). Cependant, la quantification des flux préférentiels est difficile et seules quelques études ont pu estimer la part des flux préférentiels dans le flux de drainage d'eau en bas de profil (Stone and Wilson, 2006; Legout *et al.*, 2009; Stumpp and Maloszewski, 2010).

La génération de flux préférentiels d'eau dépend surtout de l'intensité des épisodes pluvieux et de l'humidité initiale du sol lors de l'épisode pluvieux (Seyfried and Rao, 1987; Jardine *et al.*, 1990; Lennartz and Kamra, 1998; Ghodrati *et al.*, 1999; Langner *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2003; Jarvis, 2007). Pour modéliser la génération de flux, nous avons considéré plusieurs seuils d'intensité de précipitation au-delà desquels l'excédent de précipitation transfère rapidement à travers le profil de sol. Le seuil d'intensité de précipitation qui permet de reproduire au mieux l'évolution de l'humidité volumique du sol et le transfert de deutérium dans le profil de sol était le seuil de 3.5 mm.h^{-1} . Avec un tel seuil, le flux de drainage total annuel est réparti comme suit : 54% de flux préférentiels et 46% du flux matriciels. Ceci est plus élevé que la part des flux préférentiels dans le flux de drainage d'eau en bas de profil reportée par d'autres études (de 11 à 51% (Stone and Wilson, 2006), 10% (Stumpp and Maloszewski, 2010) et 17% (Legout *et al.*, 2009)) et pourrait en grande partie s'expliquer par la texture à dominante sableuse des sols de la placette.

I.3.3. Incidence possible des flux préférentiels d'eau sur les flux de drainage de nutriments

La simulation de flux préférentiels dans le profil de sol ne change pas le flux de drainage total annuel mais peut avoir des conséquences sur le calcul de flux de drainage de soluté. La

composition des eaux circulant lentement ou rapidement dans le sol peut, en effet, fortement varier (Ranger *et al.*, 1993; Marques *et al.*, 1996; Legout *et al.*, 2009). Le bilan de flux « entrées-sorties » de deutérium a été calculé de deux manières différentes : (1) en ne considérant pas les flux préférentiels (calcul « classique » le flux de drainage d'eau est couplé aux concentrations dans les bougies poreuses à 60cm de profondeur) et (2) en considérant les flux préférentiels (couplage du flux d'eau préférentiel avec les concentrations dans les plaques lysimétriques à 10cm de profondeur et couplage du flux matriciel d'eau aux concentrations dans les bougies poreuses à 60cm de profondeur). Lorsque l'on ne considère pas de flux préférentiels, le bilan en deutérium est déséquilibré (-14%) alors que le bilan en deutérium est équilibré lorsque les flux préférentiels sont pris en compte (+3%).

En appliquant les mêmes méthodes de calculs aux flux de drainage de nutriments, nous avons mis en évidence une possible sous-estimation des pertes par drainage si l'on ne considère pas les flux préférentiels. En considérant ces écoulements rapides, les flux de drainage en Ca, Mg, Al et NO₃ augmenteraient de 160%, 62%, 75% et 125% respectivement. Ces valeurs peuvent cependant légèrement surestimer les pertes pour ces éléments. Pour ce calcul, le flux de drainage préférentiel a été couplé à la composition chimique des eaux collectées par plaques lysimétriques à 10cm de profondeur. Cependant, il est possible que l'eau soit en interaction avec la phase solide même dans les écoulements rapides. En effet, il a été montré que les concentrations des eaux gravitaires changent avec la profondeur (Marques *et al.*, 1996; Ranger *et al.*, 2001; Legout, 2008). Même dans le cas de flux préférentiels et rapide d'eau, les échanges entre la phase liquide et solide ne sont pas exclus.

L'expérience de traçage et la modélisation hydrique dans le peuplement de hêtre ont donc permis d'estimer les flux d'eau au sein de l'écosystème et permettent ainsi de calculer des flux de drainage de nutriments dans le profil de sol nécessaires pour établir les bilans de flux « entrées-sorties ». Ce chapitre a permis aussi de mettre en évidence l'existence de flux préférentiels d'eau dans le profil de sol. Ces flux préférentiels jouent un rôle important dans le cycle de l'eau mais leur influence sur les flux de nutriments dans le sol reste méconnue. Les flux préférentiels d'eau pourraient engendrer des pertes accrues de Mg et de Ca en transférant très rapidement ces éléments depuis la surface jusqu'à la profondeur sans interaction avec la phase solide (réactions d'échanges d'ions...). La composition chimique de l'eau de flux préférentiels pourrait également être en interaction avec la phase solide du sol même si les vitesses d'écoulement sont élevées. Ainsi, les pertes de Mg et Ca par flux préférentiel d'eau depuis la surface seraient moins élevées.

Les résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique permettront de vérifier si le magnésium et le calcium des horizons de sol superficiels sont transférés rapidement vers les horizons profonds.

II. Tracing and modeling preferential flow in a forest soil - potential impact on nutrient leaching

Gregory van der Heijden^{(1)*}, Arnaud Legout⁽¹⁾, Benoît Pollier⁽¹⁾, Claude Bréchet⁽²⁾, Jacques Ranger⁽¹⁾, Etienne Dambrine⁽³⁾

Article publié dans GEODERMA 195-196 (2013) p. 12-22

(1) INRA - UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes forestiers, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France

(2) INRA - UMR 1137 INRA-UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestière, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France

(3) INRA - UMR 042 CARTEL, Université de Savoie, Centre Interdisciplinaire Scientifique de la Montagne, Belledonne 226, 73376 Le Bourget-du-Lac Cedex

*Corresponding author

Tel : 03 83 39 73 27

Fax : 03 83 39 40 76

gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr



Tracing and modeling preferential flow in a forest soil – Potential impact on nutrient leaching

Gregory van der Heijden^{a,*}, Arnaud Legout^a, Benoît Pollier^a, Claude Bréchet^b, Jacques Ranger^a, Etienne Dambrine^c

^a Unité Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, INRA de Nancy, Route d'Amance, 54 280 Champenoux, France

^b UMR INRA-UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestière, INRA de Nancy, Route d'Amance, 54 280 Champenoux, France

^c INRA-Université de Savoie, UMR CARRTEL, 73376 Le Bourget du Lac, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2012

Received in revised form 25 October 2012

Accepted 11 November 2012

Available online xxxx

Keywords:

Forest
Hydrology
Nutrient leaching
Preferential flow
Modeling
Tracer

ABSTRACT

Accurate nutrient budgets in forest ecosystems are needed in order to plan sustainable forest management on poor soils. Such budgets require precise measurements of water and nutrient leaching through the soil. This study aims to characterize the hydrological processes and compute hydrological budgets occurring in a very poor and acidic soil under a 30-year-old beech stand in the Morvan Mountains (France). A forest plot was set up with rain collectors, lysimeters and TDR probes, and we used a deuterated water tracing experiment and two hydrological models (BILJOU and HYDRUS-1D) to estimate the proportion of preferential and slow convective water flow, and to compute the influence of preferential flow paths on nutrient leaching.

Preferential flow paths were evidenced by the deuterium tracing experiment. Tracer dynamic through the soil and soil water content variations were successively modeled. This approach enabled us to define the main condition leading to preferential flow generation (rainfall above 3.5 mm/h) and quantify the proportion of preferential flow (54%). Finally, the computed nutrient leaching fluxes of major elements Ca, Mg, NO₃ and Al were strongly increased when considering preferential flow paths. The experimental and modeling approach proved to be complementary and we recommend the use of tracing experiments for better model calibration, especially when their outputs are used to compute nutrient leaching fluxes.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Input–output nutrient budgets are valuable diagnostic tools to determine the sustainability of forest soil fertility. Change in soil nutrient pools is computed as a mass balance of nutrient inputs (atmospheric deposition and mineral weathering flux) and outputs (net immobilization in forest biomass and leaching). As direct measurement of loss of water and nutrients by drainage is almost impossible (Bormann and Likens, 1967), nutrient leaching is often estimated by coupling the water fluxes from a deterministic flow model to nutrient concentrations in soil water. Water flow modeling has been extensively studied and there are many water flow models available (Granier et al., 1999; Kohne et al., 2009; Simunek et al., 2003; Starr, 1999) covering a wide range of complexity from whole soil profile models to finely discretized profiles, and of two different types: pool and flux models and mechanistic models generally based on Richards' equation. Nutrient leaching is particularly sensitive to water flow. Modeling water

flow is thus essential to compute precise input–output nutrient budgets (Ranger and Turpault, 1999). When using hydrological models to predict water flow at the soil profile scale, calibration and validation are generally carried out using TDR, tensiometer or moisture measurements on soil samples data sets. However, to our knowledge few forest soil hydrology studies have validated model calibrations with additional water tracing experiments.

Environmental isotopes (¹⁸O and ²H) through their natural isotopic fractionation have been widely used to trace water fluxes in ecosystems (Becker and Coplen, 2001; Ellsworth and Williams, 2007; Koeniger et al., 2010; Kulmatiski et al., 2010; Mali et al., 2007; Marc and Robinson, 2004; Meinzer et al., 2006), notably in catchment hydrology (Maloszewski and Zuber, 1982; Maloszewski et al., 1992; McDonnell et al., 1999; Viville et al., 2005). An artificially deuterated solution may also be used to trace water flow in soils. This technique allows the collection of information such as the flow velocity or the porosity involved in transfer. This step is crucial for the precise calibration and setting-up of deterministic flow or transport models (Ptak et al., 2004).

Forest soils require particular attention (Sidle et al., 2000; Uchida et al., 2001) mainly because their structure is rarely disturbed, hence the presence of well developed aggregates and pore systems, which are known to influence flow variability (Jarvis, 2007). Water transfer

* Corresponding author. Tel.: +338 83 39 73 27; fax: +338 83 39 40 76.

E-mail addresses: gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr (G. van der Heijden), legout@nancy.inra.fr (A. Legout), pollier@nancy.inra.fr (B. Pollier), brechet@nancy.inra.fr (C. Bréchet), ranger@nancy.inra.fr (J. Ranger), dambrine@nancy.inra.fr (E. Dambrine).

in soils is split into two types of transfer: a slow convective flow (matrix flow) resulting from a piston-like flow (Jardine et al., 1990; McDonnell, 1990; Rawlins et al., 1997; Sidle et al., 2000; Waddington et al., 1993) and a rapid (or preferential) flow which bypasses a large proportion of the soil (Jardine et al., 1989; Kohne et al., 2009; Kung, 1990; Legout et al., 2009; Tsuboyama et al., 1994). Occurrence of preferential flow (PF) depends mainly on boundary and initial conditions, for instance rainfall intensity and initial soil humidity (Ghodrati et al., 1999; Jardine et al., 1990; Jarvis, 2007; Langner et al., 1999; Lennartz and Kamra, 1998; Seyfried and Rao, 1987; Williams et al., 2003).

Quantification of preferential flow is of importance when estimating the nutrient leaching flux as its chemical composition is known to vary quite widely from that of slow convective flow water (Legout et al., 2009; Marques et al., 1996). Further developments are still required in this research field to provide accurate nutrient budgets; errors when estimating the nutrient leaching may have a large impact on budget results and may lead to wrong interpretations related to the sustainability of forest soil fertility. Moreover, in the context of climate change, with a possible increase in growing season duration (Kreuzwieser and Gessler, 2010; Schar et al., 2004), understanding and modeling water flow is essential for both plant available water and nutrient fluxes.

The scope of the present study was to develop practical knowledge in forest soil hydrology on a 35-year-old beech stand using a tracing experiment (^2H), retrospective use of several datasets (soil, weather, TDR....) and hydrological modeling. The study aims to:

- (i) characterize hydrological processes occurring in an acidic soil under a 35-year-old beech stand in the Morvan Mountains (France) through an artificially deuterated water tracing experiment;
- (ii) model water flow and non-reactive solute transport with two hydrological models (BILJOU and HYDRUS-1D) and estimate the proportion of preferential and matrix water flows;
- (iii) compare the performances of BILJOU and HYDRUS-1D
- (iv) evaluate the potential influence of preferential flow paths on the estimation of nutrient leaching.

The practical goal was to produce a data set of water fluxes on this site, for future computing of nutrient input–output budgets.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The experimental site of Breuil-Chenu forest (hereafter named Breuil-Chenu site) is located in the Morvan Mountains, Burgundy, France (latitude $47^{\circ}18'10''$, longitude $4^{\circ}4'44''$). The elevation is 640 m, the annual rainfall 1180 mm, the mean annual potential evapo-transpiration (PET) 750 mm and the mean annual temperature 9°C (computed over the period 2006–2010). The soil is an Alocrisol (Alumic Cambisol; WRB FAO) displaying micro-podzolization features in the upper mineral horizon. The humus is a dysmoder with three layers (L, F and H) (Ranger et al., 2004). The native forest was an old coppice with standards, a traditional European system of management where timber trees (standards) are grown above a coppice. In 1975, part of the native forest

located on a homogeneous soil type was clear-cut. Plots covering 1000 m^2 were defined and each plot was planted with one species: beech (*Fagus sylvatica* L.), oak (*Quercus sessiliflora* Smith), Norway spruce (*Picea abies* Karst), Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Franco), Corsican pine (*Pinus nigra* Arn. ssp. *Laricio* Poiret var. *corsicana* Hyl.) and Nordmann fir (*Abies Nordmanniana* Spach). The present study focused on the beech plot.

2.2. Soil physical properties

The soil texture at the Breuil-Chenu site was measured in four soil profiles (0 to 70 cm depth). A description of soil properties is given in Table 1. Bulk density (total soil dry mass per volume unit) was measured from 15 profiles sampled with a cylindrical corer. The mean values of the real density (density of soil particles) for each soil level were calculated as follows:

$$D_i = \frac{1}{\left(\frac{1-2 \times C_i}{2.6}\right) + \left(\frac{2 \times C_i}{1.6}\right)} \quad (1)$$

where D_i ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) is the real density of level i and C_i ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) the rate of total organic carbon in level i , 2.6 ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) the real mineral density and 1.6 ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) the real organic density.

The mean values of the real and soil bulk density were then used to compute the mean porosity of the soil levels as follows:

$$\text{Porosity}_i = \left(1 - \frac{Db_i}{D_i}\right) \times 100 \quad (2)$$

where Porosity_i (%) is the porosity of level i , Db_i ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) the soil bulk density of level i , and D_i the real density ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) of level i .

2.3. Weather data

A weather station located on the Breuil-Chenu site monitored rainfall (RF), wind speed, temperature, air humidity, solar radiation on a daily basis and bulk rainfall was also collected monthly in a clearing 500 m from the Breuil-Chenu site with a PEHD bucket. The Penman–Monteith equation was used to compute potential evapotranspiration (PET). Statistical models were fitted between nearby METEO FRANCE (French national weather institute) weather stations (Quarré-les-tombes at 9 km from the Breuil-Chenu site for RF; Chateau-Chinon for PET at 28 km) so as to predict the missing daily PET and rainfall records. Potential errors in the RF and PET data base measured at the Breuil-Chenu site were tested by comparing monthly records with the nearby METEO FRANCE weather stations.

Rainfall intensity is known to be an important factor in preferential flow generation and heavy RF events are frequent at the Breuil-Chenu site (Fig. 1). Indeed, over the 2006–2010 period, 56% of RF occurred at an intensity higher than 10 mm per day and 26% at an intensity higher than 20 mm per day. While these heavy RF events occur frequently throughout the year, the proportion of rainfall occurring at over $20\text{ mm} \cdot \text{day}^{-1}$ is much higher during the summer when the soil is dry (Fig. 1).

Table 1

Description of the soil in the beech stand at the Breuil-Chenu experimental site. Values in brackets represent standard deviations.

Horizon	Depth cm	Bulk density	Calculated real density	Calculated total porosity %	Total organic carbon $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	Sand %	Silt %	Clay %
A1/E	0–5	0.75 (0.16)	2.38	68.4	0.07	57.6 (2.7)	21.8 (2.3)	20.6 (0.6)
A1-A1/Bp	5–10	0.97 (0.17)	2.46	60.6	0.05	60.2 (3.2)	21.5 (2.8)	18.3 (0.7)
Sal 1	10–15	1.07 (0.18)	2.49	57.0	0.03	58.0 (3.6)	23.6 (2.8)	18.4 (1.0)
Sal 2	15–25	1.27 (0.13)	2.53	49.8	0.02	60.0 (4.2)	24.1 (3.5)	16.0 (0.9)
Sal 2	25–40	1.21 (0.14)	2.56	52.6	0.01	57.8 (3.1)	24.7 (2.7)	17.5 (1.2)
Sal 3	40–55	1.46 (0.15)	2.60	43.9		55.7 (5.0)	25.8 (3.3)	18.5 (1.9)
II Sal 4	55–70	1.50 (0.08)	2.60	42.5		57.3 (5.1)	25.3 (2.8)	17.5 (2.4)

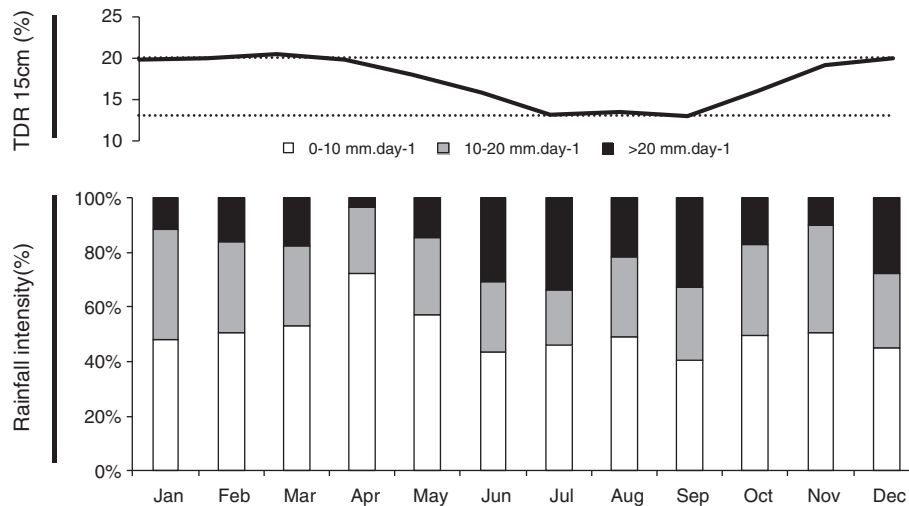


Fig. 1. Mean monthly rainfall intensity computed over the 2006–2010 period at the Breuil-Chenué site expressed as the proportion of monthly rainfall: from 0 to 10, 10 to 20 and over 20 mm per day. Mean monthly soil volumetric water content (%) was computed over the 2006–2010 period from the TDR probes at 15 cm depth (continuous line), soil water content at field capacity and at the wilting point are represented by the dotted lines.

2.4. Tracing experiment and sample analysis

A tracing experiment was carried out in a subplot of the beech plot (hereafter named tracing plot). The tracing plot covered 80 m²; it was equipped for solution monitoring. Forest floor seepage was collected with 3 replicates of zero tension lysimeters (ZTL). Soil solution was collected with 3 replicates of ZTL at 10 cm depth and tension cup lysimeters (TCL) at 15, 30 and 60 cm depth (4 replicates at each depth). Time domain reflectometry (TDR) probes monitored the soil water content at 15, 30 and 60 cm (5 replicates at each depth). A daily mean value of soil water content was calculated for each depth from the 5 repetitions for model calibration.

On April 7th 2010, the tracer solution (deuterated water; $\delta_{SMOW} = 20,400\%$) was sprayed on the forest floor of the tracing plot representing a 0.25 mm rainfall event. 16 mm of demineralized water was sprayed on the tracing plot over a period of 8 h so as to simulate a natural rainfall event and to avoid rapid deuterium evaporation.

Solutions were collected every 28 days. However to monitor rapid transfers in the soil, solutions were first collected every 2 h, then the time lapse between sampling was gradually increased (6 h, 24 h, 7 days, and 14 days). Collected solutions were filtered on the field (0.2 μ m nylon filters) and stored in 2 mL glass vials with PTFE caps at 4 °C. Hydrogen isotopic composition was measured by IRMS (GV Instruments, Isoprime). Calcium and magnesium concentrations were measured by ICP-AES (Jobin-Yvon 180 Ultrace) and nitrate concentrations were measured by molecular absorption spectro-colorimetry (SKALAR). Missing values were predicted by an empirical model as follows:

$$Concentration(t) = \frac{Concentration(t-1) + Concentration(t+1)}{2} \quad (3)$$

where $Concentration(t)$ is the concentration of the element at the time step t .

2.5. Hydrological models

Two existing dynamic hydrological models, BILJOU and HYDRUS-1D, were used to assess water flow in the Breuil-Chenué beech stand soil profile. BILJOU is a pool and flux water balance model. A detailed description of BILJOU is given by Granier et al. (1995, 1999). HYDRUS-1D

is a software package for simulating water, heat and solute movement in one-dimensional variably saturated media. A detailed description of HYDRUS-1D is given by Šimůnek et al. (2008). Both models were calibrated with a four-year TDR data set (2006–2009). To compare BILJOU and HYDRUS-1D, the same inputs and ecosystem parameters were implemented: rainfall, PET, vertical root distribution. BILJOU was designed to simulate water flow in forest ecosystems from rain above the canopy to drainage at the bottom of the soil profile. HYDRUS-1D being conceived for modeling water flow in agricultural soils, throughfall and actual evapo-transpiration (AET) data predicted by BILJOU were implemented into HYDRUS-1D. This study thus focuses on comparing modeled water flows in the soil profile.

The transport of a non-reactive solute was modeled with HYDRUS-1D and an additional mixing module was developed (description below) in BILJOU to simulate non-reactive solute transfer from BILJOU water flux outputs. Each soil layer is composed of plant-available water and fine micro-porosity water. Drainage water entering layer i is mixed with plant-available water in layer i . Plant-available water is then mixed with $k\%$ of the fine micro-porosity water (k is a function of the actual plant-available water over maximum plant-available water ratio). Concentration in fine micro-porosity water is then homogenized. Finally, solute concentration in the drainage flux from layer i is equal to the concentrations in plant available water in layer

2.6. Modeling preferential flow

In the present study, preferential flow (PF) is defined as a water flux which bypasses most of soil total volume. The proportion of preferential flow was determined with a modeling approach. BILJOU and HYDRUS-1D model preferential flow through an implemented macroporosity parameter in BILJOU and the dual-porosity model in HYDRUS-1D. We could have used these tools but estimating dual-porosity parameters generates further uncertainty in simulation. Furthermore, model daily drainage outputs do not account for the contribution of preferential flow to the total drainage flow. When preferential flow was not modeled, 100% of the rainfall was considered as matrix flow (Table 2). In other cases, preferential flow (PF) was simulated by considering that above a given rainfall intensity threshold, preferential flow paths are triggered (Williams et al., 2003). When the hourly rainfall records exceeded a given threshold, excess rainfall was considered to drain rapidly until a six hour period free of rain occurred. Three different thresholds were tested:

Table 2
Summary of the different scenarios simulated.

Type	Abbreviation	Description	Model used
Water fluxes	100%RF	Input = 100% of rainfall (no preferential flow)	HYDRUS-1D and BILJOU
	RF < X mm · h ⁻¹	Input = rainfall below the threshold X mm · h ⁻¹ , rainfall above the threshold was considered as preferential flow and does not interact with the soil	HYDRUS-1D and BILJOU
	PF (X mm · h ⁻¹)	Input = rainfall below the threshold X mm · h ⁻¹ , rainfall above the threshold was considered as preferential flow. Preferential flow transfers to matriciel water as a function of soil water content	BILJOU
Deuterium mass balance	MB(100%RF)	The deuterium drainage outflux was computed with the 100%RF scenario: the water drainage flux was coupled with 60 cm depth TCL deuterium concentrations	BILJOU
	MB(PF X mm · h ⁻¹)	The deuterium drainage outflux was computed with the PF (X mm · h⁻¹) scenario: the slow water drainage flux was coupled with 60 cm depth TCL deuterium concentrations and preferential flow was coupled with 10 cm depth ZTL deuterium concentrations	BILJOU
Nutrient leaching fluxes	NLF(100%RF)	Nutrient leaching flux computed with the water drainage flux simulated with the 100%RF scenario: water drainage was coupled with 60 cm depth TCL concentrations	BILJOU
	NLF(PF X mm · h ⁻¹)	Nutrient leaching flux computed with the water drainage flux simulated with the PF (X mm · h⁻¹) scenario: slow water drainage was coupled with 60 cm depth TCL concentrations and preferential flow was coupled with 10 cm depth ZTL concentrations	BILJOU

2 mm · h⁻¹, 3.5 mm · h⁻¹ and 5 mm · h⁻¹ (Table 2). Water transfer from preferential flow to matrix water was computed for soil layers below 15 cm depth as follows, as a function of soil water content:

$$PF(input)_i = (W_{max,i} - W_i) \times \alpha \quad (4)$$

where $PF(input)_i$ is the water input to the soil layer i from preferential flow, $W_{max,i}$ the maximum water retention capacity of the soil for the soil layer i (mm), W_i the soil layer i water content (mm) and α a fitted parameter for the whole soil profile.

2.7. Deuterium mass balance and nutrient leaching fluxes

A deuterium mass balance model was conceived to assess deuterium mass flow through the ecosystem and validate the modelled proportion of rapid and slow convective water flow. The deuterium mass balance was computed as the difference between the inputs (throughfall) and outputs (AET and drainage) of deuterium over the tracing experiment period. The deuterium evapo-transpiration flux was segmented into three fluxes from three soil layers (0–15 cm, 15–30 cm and 30–70 cm). The deuterium evapo-transpiration flux was obtained by multiplying the AET water flux from a given soil layer (model output) by the deuterium concentration in the soil layer (estimated from the tension cup lysimeters). The rapid deuterium drainage flux was estimated by multiplying the simulated preferential flow water flux by deuterium concentrations in ZTL at 10 cm depth. The matrix deuterium drainage flux was estimated by multiplying the simulated matrix water flux by deuterium concentrations in TCL at 60 cm depth (Table 2).

Deuterium concentration in soil solution samples was computed from measured hydrogen isotopic fractionation results expressed in per thousand:

$$C_{2H}(sample) = \frac{\left(\frac{^2H}{^1H}\right)_{SMOW} \times \left(\frac{\delta^2H}{1000} + 1\right)}{1 + \left(\frac{^2H}{^1H}\right)_{SMOW} \times \left(\frac{\delta^2H}{1000} + 1\right)} \times \left(2 \times \frac{\rho_{eau}}{M_{H_2O}}\right) \quad (5)$$

where $C_{2H}(sample)$ is deuterium concentration in the sample (mol · L⁻¹), $\left(\frac{^2H}{^1H}\right)_{SMOW}$ the isotopic ratio of SMOW reference material, δ^2H the deuterium fractionation (‰), ρ_{eau} water relative mass density (kg · m⁻³) and M_{H_2O} water molar mass (g · mol⁻¹). Deuterium excess concentration was then computed by subtracting the concentration due to deuterium natural abundance in our ecosystem (circa 70‰) to the deuterium concentration in the sample.

Calcium, magnesium and nitrate leaching fluxes were estimated in two different ways: 1) by coupling 60 cm depth TCL measured

concentrations to the model-simulated total water flux at 60 cm depth, and 2) by coupling 60 cm depth TCL measured concentrations to the model-simulated matrix water flux and coupling the preferential water flux to 10 cm depth ZTL measured concentrations (Table 2).

3. Results

3.1. Breuil-Chenue weather data validation

The Breuil-Chenue weather data records (RF and PET) were compared to those of two nearby METEO FRANCE weather stations on a monthly basis over the 2006–2011 period to check for measurement errors in the Breuil-Chenue data set (Fig. 2). Between weather stations, both monthly RF and PET were statistically significantly correlated over the study period: $p < 0.0001$ and $R^2 = 0.85$ for RF, and $p < 0.0001$ and $R^2 = 0.84$ for PET. Mean monthly differences (METEO FRANCE-Breuil-Chenue) were -1.6 mm · month⁻¹ for RF and 4.3 mm · month⁻¹ for PET records over the 2006–2011 period. Mean monthly differences (METEO FRANCE -Breuil-Chenue) were slightly higher over 2010–2011: 6.6 mm · month⁻¹ for RF and 13.7 mm · month⁻¹ for PET.

3.2. Tracing water fluxes with deuterated water

The monitoring of deuterium concentrations in soil solution shows the successive occurrence of deuterium elution peaks through the profile (Fig. 3). Maximum elution peaks occurred on average for 110 mm of percolated water (throughfall–evapo-transpiration) at 15 and 30 cm depth (around mid-June 2010) and on average for 505 mm at 60 cm depth (around mid-November 2010). Monitored solutions at 30 cm (replicate 2) and 60 cm (all 4 replicates) showed the occurrence of two successive elution peaks (Fig. 3): for 305 mm of percolated water at 30 cm depth and for 230 to 307 mm of percolated water at 60 cm depth. High spatial variability (maximum elution peak value and occurrence) was observed for the four replicates of TCL at the three depths. Maximum elution peak values varied from 0.1% to 0.35% of the applied concentration at 15 cm, from 0.06% to 0.25% at 30 cm and from 0.01% to 0.13% at 60 cm. Maximum elution peaks occurred from 83 to 116 mm of percolated water at 15 cm depth, 24 mm to 188 mm at 30 cm and from 435 mm to 528 mm at 60 cm depth.

Preferential flow was observed with the 10 cm depth ZTL. High C/C_0 were measured only a few hours after the application of the deuterated water and decreased slowly until August 10th 2010 (171 mm of percolated water). ZTL replicates showed low variability. One replicate set of TCL (replicate 3) showed the occurrence of very rapid water flow at 15

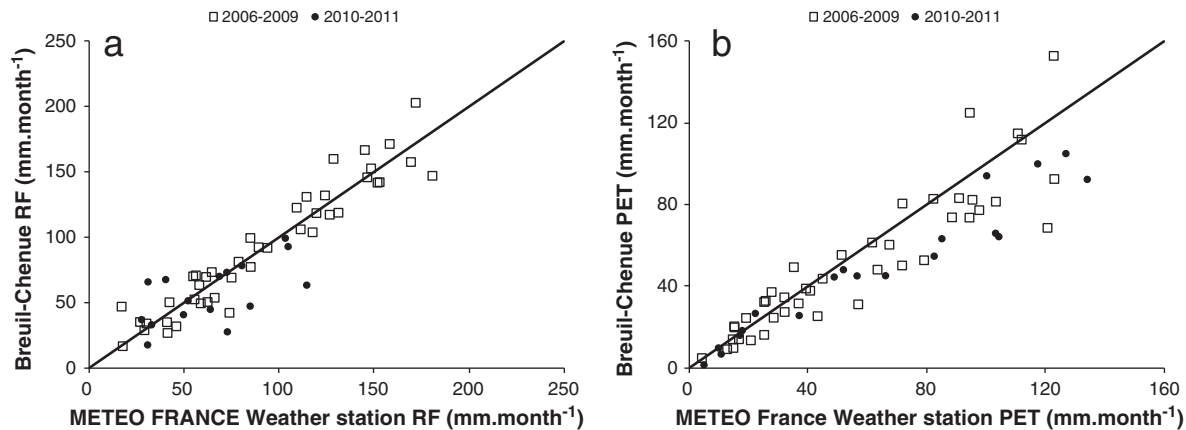


Fig. 2. Comparison of monthly weather data records measured at the Breuil-Chenu experimental site and two METEO-FRANCE weather stations (Quarré-les-tombes at 9 km from the Breuil-Chenu site for RF; Chateau-Chinon for PET at 28 km) over the 2006–2011 period for (a) rainfall (RF) and (b) potential evapo-transpiration (PET) records.

and 30 cm depth. Higher concentrations were observed on April 20th 2010 at both depths compared to the other replicates (Fig. 3).

3.2.1. Estimation of flow velocities

Soil porosity implied in water flow may be estimated as the inverse of the effective water flow velocities expressed in millimeters of tracer displacement per millimeter of percolated water (Table 3). Flow velocities varied from 1.3 to 1.8 mm·mm⁻¹, 1.6 to 13 mm·mm⁻¹ and 1.1 to 1.4 mm·mm⁻¹ at respectively 15, 30 and 60 cm depth. The porosities computed correspond to percentages of the total soil volume and varied from 56 to 78%, from 8 to 63% and from 73 to 88% at respectively 15, 30 and 60 cm depth.

3.2.2. Modeling water and solute fluxes without preferential flow

BILJOU and HYDRUS-1D were used to simulate water and solute fluxes in the 35-year-old beech stand soil. Model calibration was assessed with the mean error and root mean square error (computed for the vegetation season: April to October) between predicted and measured soil volumetric water content (TDR probes) and with the difference between predicted and experimental occurrences of the maximum elution peaks (expressed in percolated millimeters) (Table 4). The two models were initially calibrated using measured and estimated parameters as described previously: 100%RF scenario (Table 2). Both model calibrations were unsatisfactory both for soil volumetric water content and solute transfer prediction. Mean errors and root mean square errors were high because the vegetation season was poorly simulated: predicted values were systematically higher than measured soil volumetric water content. Simulated elution peaks were relatively well synchronized with the tracing experiment at 15 and 30 cm depth. However, the simulated tracer reached 60 cm depth much too fast (delta elution peak of -342 mm for HYDRUS-1D and -317 mm for BILJOU).

3.3. Modeling water and solute preferential flow

The influence of preferential flow paths on water and solute transfer in the soil was tested by reducing rainfall input into both models according to different rainfall intensity thresholds: $RF < 2 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$, $RF < 3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$, and $RF < 5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ scenarios (Table 2). As a result, annual rainfall was respectively reduced by 55, 30 and 20% for the three different rainfall intensity thresholds. For all three thresholds, the simulation of tracer concentrations at 60 cm was highly improved compared to 100%RF: the delta elution peak varied from -64 to -86 mm for HYDRUS-1D and from -53 to -67 mm for BILJOU. Reducing rainfall input to both models only slightly improved the occurrence of deuterium elution peaks at 15 and 30 cm depth for both thresholds:

$RF < 3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$, and $RF < 5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ (Table 4). Elution peaks were correctly simulated with $RF < 2 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ by HYDRUS-1D but the elution peak at 30 cm depth was simulated much too late 310 mm for BILJOU. Whatever the threshold considered, goodness of fit between simulated and measured soil water content was not improved compared to 100%RF and the rainfall reduction generated a transpiration deficit or drought.

The simulation of both soil water content and tracer transfer was improved (Table 4) with the $PF 3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ scenario (Table 2). Although, the tracer transfer simulation was very similar to that of the $RF < 3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ scenario, soil water content mean and root mean square errors were highly improved compared to $RF < 3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$. Moreover, the $PF 3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ scenario reduced the water deficit compared to the $RF < 3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$.

3.4. Impact of preferential flow paths on the deuterium mass balance and nutrient leaching fluxes

Deuterium input-output budgets were computed over one year (April 2010 to April 2011) using measured hydrogen isotopic composition in throughfall and soil solution, and BILJOU computed water fluxes in the soil and soil water uptake (Fig. 4). The influence of preferential flow on deuterium input-output budgets was tested. When preferential flow was simulated, input-output budgets were close to equilibrium from January 2011 onwards (3% of initial applied tracer remained from February 2011 onwards) which coincided with the elution peaks at all three depths (Fig. 3). When no preferential flow was taken into account, deuterium input-output budgets became negative from December 2010 onwards. An output excess of 14% of initial applied tracer was computed over a year.

Fig. 5 presents the influence of preferential flow paths on computed nutrient leaching fluxes at 60 cm depth over 2010 and 2011 for calcium, magnesium, nitrate and aluminum. Generally, leaching fluxes were highest during winter periods. However, the different nutrients showed different leaching dynamics. Calcium, magnesium and aluminum leaching rates were fairly well related to the water drainage flux: leaching rates were mostly constant over 2010–2011. The nitrate leaching flux was related to nitrate concentration in soil solutions: low during vegetation growth periods and high during winters. When PF was considered, the nutrient leaching flux increased by 2.5, 1.7, 2.3 and 1.8 fold for calcium, magnesium, nitrate and aluminum respectively (Table 5) and differences between both calculation methods ($NLF(100\%RF)$ and $NLF(PF 3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1})$; Table 2) were mainly due to the winter periods during which PF had a stronger effect on estimated nutrient leaching fluxes.

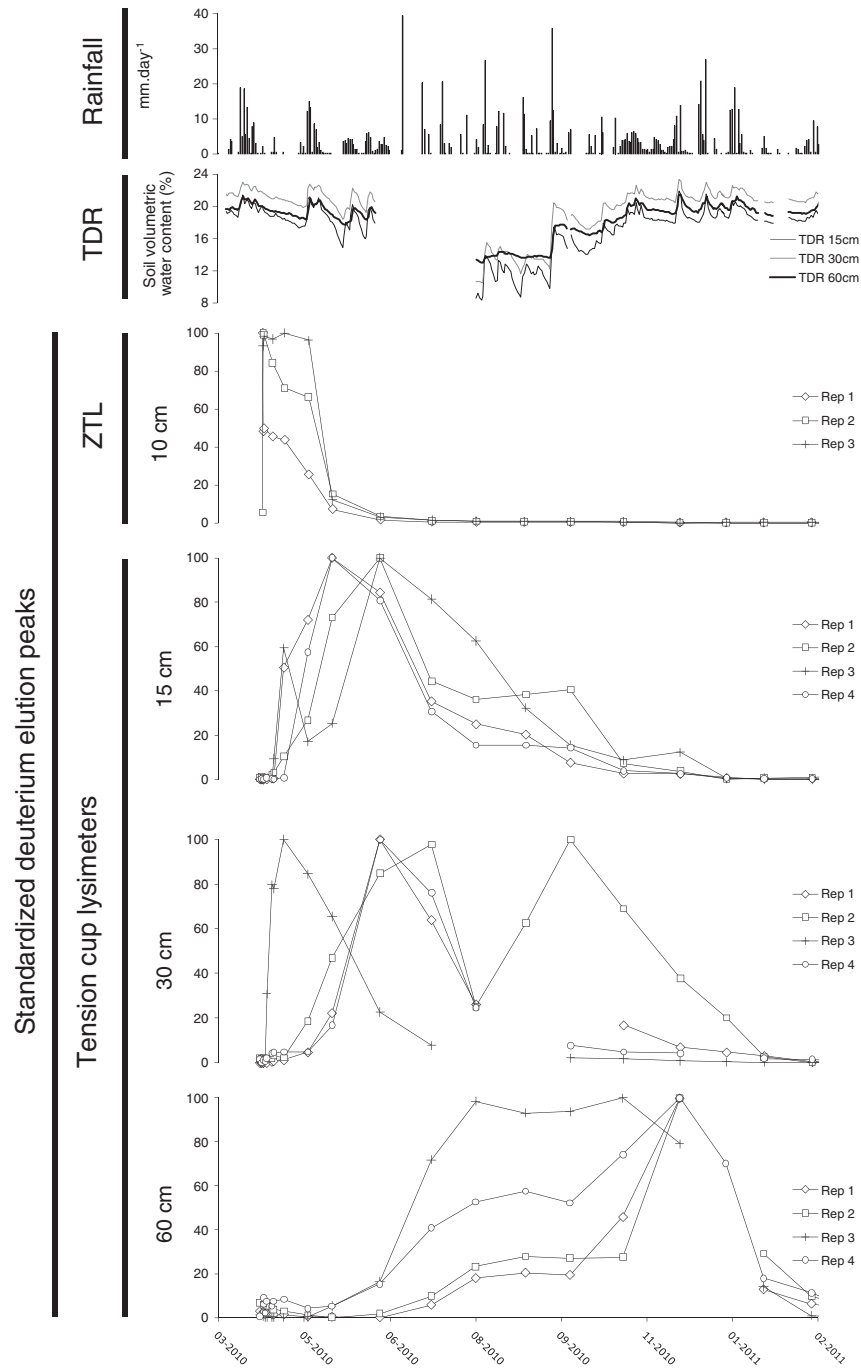


Fig. 3. Artificially deuterated water tracing elution peaks in the soil monitored by a ZTL at 10 cm depth and TCL at 15, 30 and 60 cm depth plotted against time. Concentrations were standardized with the elution peak maximum (C/C_{max}) of each replicate. Rainfall and soil volumetric water content are also represented: rainfall is expressed in $mm \cdot day^{-1}$ and monitored soil volumetric water content is expressed in percent.

Table 3

Computed water flow velocities using the maximum of elution peaks and water flow porosity computed from the inverse of water flow velocities for the four repetitions of TCL at 15, 30 and 60 cm depth. Flow velocities are expressed in millimeters of tracer displacement per millimeter of percolated water (throughfall–evapo–transpiration) and water flow porosities are expressed in percentage of soil total volume.

Depth	Flow velocity ($mm \cdot mm^{-1}$)				Computed water flow porosity (%)					
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Mean	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Mean
15 cm	1.8	1.3	1.3	1.3	1.4	56%	78%	78%	78%	72%
30 cm	2.6	1.6	13.0	2.6	4.9	39%	63%	8%	39%	37%
60 cm	1.1	1.1	1.4	1.1	1.2	88%	88%	73%	88%	84%

4. Discussion

4.1. Water tracing experiment and evidence of preferential flow

Computed water flow velocities for all four replicates were similar at 60 cm depth with values ranging from 1.1 to 1.4 mm of tracer displacement per millimeter of percolated water (TF-AET) (Table 3). However, velocities were much more variable at 15 and 30 cm depth. Velocities ranged from 1.3 to 1.8 $mm \cdot mm^{-1}$ at 15 cm depth and from 1.6 to 13 $mm \cdot mm^{-1}$ at 30 cm depth. One replicate set of TCL at 15 cm and 30 cm depth showed the occurrence of preferential

Table 4
BILJOU and HYDRUS-1D calibration using the TDR soil water content data set over the 2006–2010 period and an artificially deuterated water tracing experiment for the different models tested: 100%RF, $RF < X \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$ and $PF(X \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1})$. Scenarios are detailed in Table 2. Goodness of fit between predicted and measured soil water content values is expressed with mean error and root mean squared error at 15, 30 and 60 cm depth (computed over the vegetation seasons), TR deficit (transpiration deficit) is expressed as the cumulated difference between potential transpiration and simulated transpiration (mm) over 2010, differences between the occurrence of simulated and measured elution peaks (simulated-measured) is expressed in percolated millimeters at 15, 30 and 60 cm depth.

		Mean error RMSE			TR deficit			Delta elution peak (percolated mm)			
		15 cm	30 cm	60 cm	15 cm	30 cm	60 cm	2010	15 cm	30 cm	60 cm
BILJOU	100% RF	1.49	1.05	0.15	4.75	4.32	2.56	0.00	-55.2	-30.5	-317.5
	$RF < 2 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$	-5.57	-8.39	-9.05	7.26	9.39	9.41	65.20	8.2	310.2	-58.4
	$RF < 3.5 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$	-2.64	-6.50	-3.32	5.44	7.61	3.91	36.70	-27.8	-27.3	-52.6
	$RF < 5 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$	-1.28	-4.52	-2.76	5.15	6.38	3.46	31.20	-55.2	-27.3	-66.9
HYDRUS 1D	100% RF	2.67	1.40	2.42	4.34	3.65	3.23	9.64	-85.3	-57.9	-342.2
	$RF < 2 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$	-3.41	-5.46	-1.19	4.67	6.45	2.35	135.76	-69.8	2.3	-85.6
	$RF < 3.5 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$	-1.48	-3.51	-0.34	3.34	4.65	1.89	82.73	-85.3	-57.9	-63.5
	$RF < 5 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$	-1.45	-3.58	-0.42	3.04	4.57	1.84	72.56	-85.3	-57.9	-85.6
BILJOU	$PF (3.5 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1})$	-2.21	-1.90	-1.34	5.27	4.11	1.92	0.00	-27.8	-27.3	-55.4

flow: $6.5 \text{ mm} \cdot \text{mm}^{-1}$ at 15 cm depth and $13 \text{ mm} \cdot \text{mm}^{-1}$ at 30 cm depth. Computed velocities at 30 cm depth were in agreement with previous studies (Legout et al., 2009). However, velocities computed at 15 and 60 cm depth were slower than those found by previous studies. As the computed velocities correspond to the distance travelled by the tracer per unit length of percolation flux, the inverse of flow velocity estimates the percentage of soil total volume used by water flow (Table 3). The computed porosities from the tracing experiment were in agreement with possible total porosities for sandy soils and computed porosities (Table 1) at 30 cm depth. However, at 15 and 60 cm depth, computed porosities from the tracing experiment reached absurd values ranging from 56% to 88% of the soil total volume. Furthermore, the computed porosity for the second elution peak observed in the TCL replicate 2 at 30 cm depth was 129%. The percolation flux used to calculate the water flow velocity must thus be over-estimated. The following hypotheses could explain such an over-estimation: (1) over-estimation of RF and/or TF, (2) underestimation of PET and/or AET, and (3) the occurrence of preferential flow in the soil profile (part of the percolation flux does not participate in the piston effect on tracer displacement).

An error of over 200 mm of TF or AET over 2010 would be necessary to explain such a discrepancy in flow velocities. BILJOU has been proved to efficiently model TF generation and PET conversion into AET over a wide range of beech stands (Granier et al., 1999). Furthermore, an error in RF interception estimation cannot account for a $200 \text{ mm} \cdot \text{year}^{-1}$

error in percolation flux. Moreover, modeled interception was validated with measured TF (the mean monthly difference between measured and predicted values was of $-5.7 \text{ mm} \cdot \text{month}^{-1}$) and was in agreement with estimated interception values in beech stands (Augusto et al., 2002; Aussenac and Boulangeat, 1980). The weather data records measured at the Breuil-Chenu site were very similar to nearby METEO FRANCE weather stations (Fig. 2) over the 2006–2011 period. RF or PET estimation errors at the Breuil-Chenu site would thus not explain such an over-estimation in the percolation flux. Finally, BILJOU predicted on average $390 \text{ mm} \cdot \text{year}^{-1}$ of AET over the 2006–2010 period which is within expected values for a beech stand in a semi-continental climate (Aussenac, 1972; Wilson et al., 2001). Finally, such differences between weather stations are the result of local climate variability. The only likely hypothesis to explain the over-estimation of the percolation flux would thus be the occurrence of preferential flow.

The equipment of the tracing plot may not be ideal for experimentally quantifying preferential flow paths as only four replicates of TCL at each depth were available and TCL have been proven to collect slow convective water and only part of rapid flow water (Legout et al., 2009; Marques et al., 1996). However, preferential flow was observed in the ZTL at 10 cm depth, in one replicate of TCL at 15 and 30 cm depth and in all four replicates at 60 cm depth (Fig. 3). Quantifying the proportion of preferential flow occurring in the soil profile had to be carried out with a modeling approach.

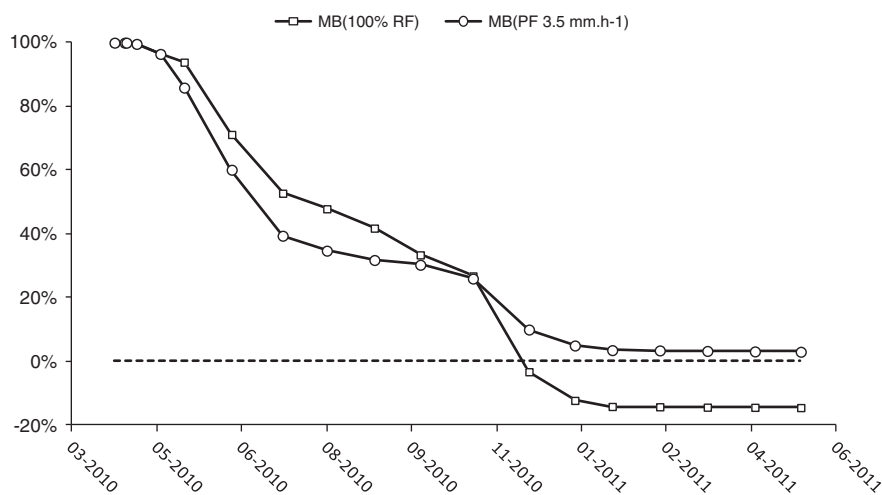


Fig. 4. Deuterium input-output budgets (expressed in percent of applied tracer) computed with BILJOU outputs from the different models: MB(100%RF) and MB(PF X mm/h). Scenarios are detailed in Table 2.

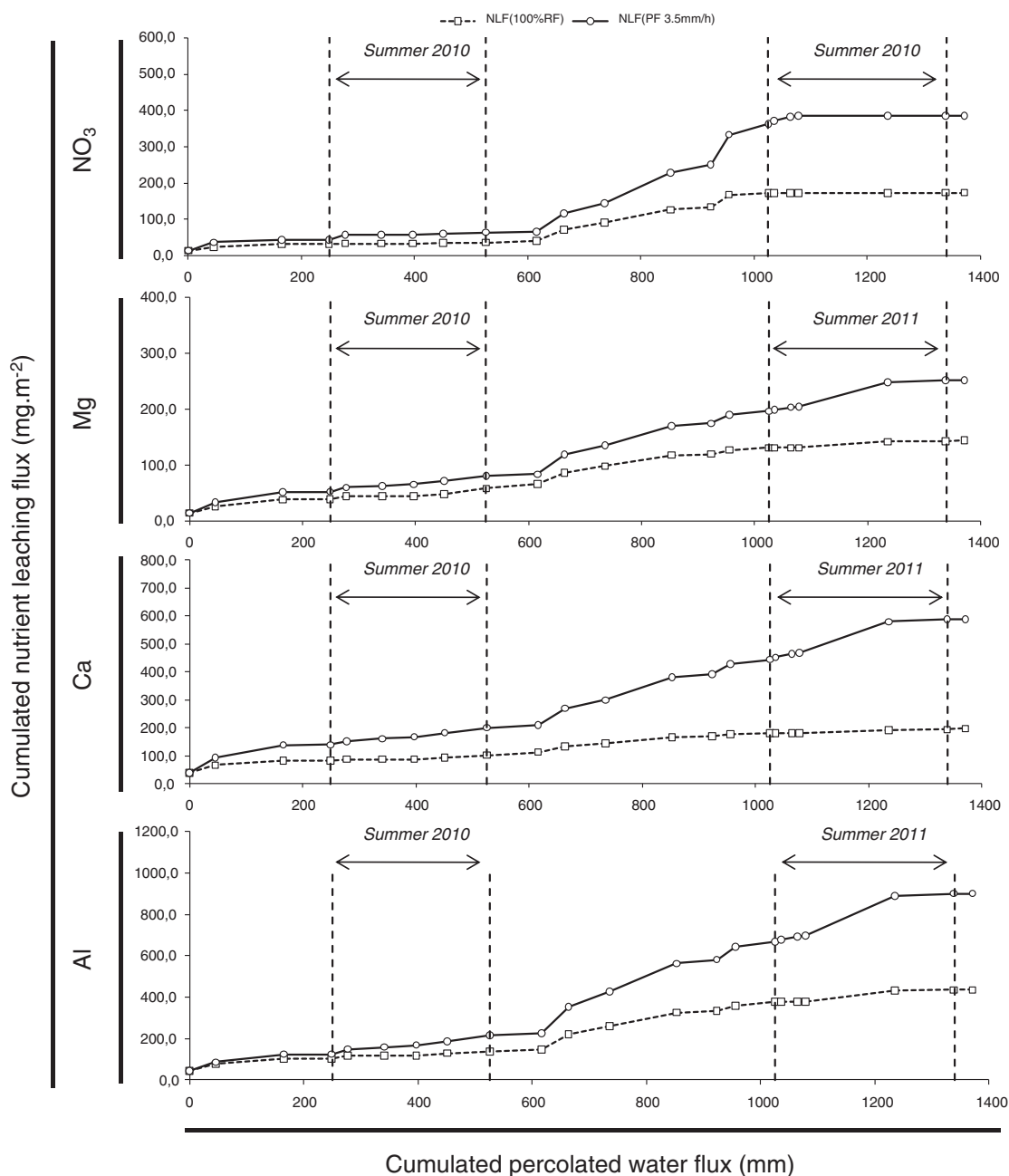


Fig. 5. Cumulated nutrient leaching fluxes ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$) at 60 cm depth over 2010–2011 against the cumulated percolated water flux (mm) calculated for calcium, magnesium and nitrate using BILJOU water drainage flux outputs from the different models: *NLF(100%RF)* and *NLF(PF X mm/h)*. Scenarios are detailed in Table 2. The dotted vertical lines represent the limits of the vegetation seasons (April to September).

4.2. Hydrological modeling and preferential flow at the soil profile scale

PF generation was the most sensitive parameter for the calibration (TDR and elution peak occurrence) of both models (HYDRUS-1D and BILJOU). PF generation enabled to simulate elution peaks at 60 cm close to those observed during the tracing experiment.

As PF generation depends on boundary and initial conditions, different rainfall intensity thresholds ($2, 3.5$ and $5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$) above which PF was simulated were tested. The best simulations for both models (HYDRUS-1D and BILJOU) were obtained with the $3.5 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ threshold which was in agreement with thresholds found by previous studies (Edwards et al., 1992; Luxmoore et al., 1990; Sidle et al., 2000; Turton et

Table 5

Nutrient leaching fluxes at 60 cm depth over 2010–2011 calculated for calcium, magnesium and nitrate using BILJOU water drainage flux outputs from the different models: *NLF(100%RF)* and *NLF(PF X mm·h⁻¹)*. Scenarios are detailed in Table 2.

	Ca $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$	Mg $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$	NO_3 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$	Al $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{year}^{-1}$
<i>NLF(100%RF)</i>	1.4	1.0	0.8	1.6
<i>NLF(PF < 3.5 mm·h⁻¹)</i>	3.1	1.3	1.8	2.8

al., 1995; Williams et al., 2003). The fit between BILJOU predicted and measured soil water content values was improved by modeling water transfer from preferential flow paths to matrix flow (Table 4). However, 100%RF with BILJOU remained the best calibration to the TDR data set. Calibration was a compromise between soil water content and non-reactive solute transport prediction.

Our threshold method for estimating PF occurrence generated PF mainly during the summer season: 45% of total 2010 annual predicted PF occurred during the months of July, August and September. This is in agreement with the change in water flow velocities between 30 and 60 cm depth observed with the tracing experiment (Table 3). Indeed, from April until June, predicted PF accounted for only 11% of the 2010 annual predicted PF and the deuterium elution peak at 30 cm depth occurred around mid-June 2010. From July to September, predicted PF was much higher meaning that only part of the percolation flux takes part in the piston-like flow of the tracer. Water flow velocities at 60 cm depth were thus reduced. New computed velocities ranged from 2 to 3 mm·mm⁻¹. Estimated soil total volume used by the water flow was thus reduced to 33 to 49% which is in agreement with possible total porosities for sandy soils and computed porosities (Table 1). Soil initial water content is also known as an important factor when considering PF generation (Jardine et al., 1990; Jarvis, 2007) however, rainfall intensity was the main factor in PF generation at the Breuil-Chenue site. Indeed, many heavy rainfall events occur during the summer (Fig. 1). PF is very likely to occur after such rainfall events even if the soil is dry. Soil organic matter is known to present hydrophobic properties thus reducing soil wettability (Capriel et al., 1995; Simon, 2007; Simon et al., 2009). Such soil properties may explain how PF is generated although soil water content is not at field capacity.

Many studies using water tracers have shown the importance of preferential flow paths in soil hydrological processes (Allaire et al., 2009; Deeks et al., 2008; Feyen et al., 1999; Legout et al., 2009; Stump and Maloszewski, 2010; Williams et al., 2003). Preferential flow contribution to the total drainage flux estimated at the Breuil-Chenue site was within the range found by previous studies. In an agricultural soil, Stone and Wilson (2006) estimated that PF contributed 11 to 51% of total drainage flow and Stump and Maloszewski (2010) found that PF accounted for up to 10% of the drainage flux. In a forest soil, Legout et al. (2009) estimated that 17% of the drainage flux was rapid transfer.

Modeled water fluxes (both preferential and matrix flow) through the soil profile were validated with the deuterium input–output budget (Fig. 4). The MB(100%RF) scenario generated an excess of deuterium output in drainage waters resulting in a negative mass balance (–14%). Estimating nutrient leaching fluxes due to preferential flow paths is difficult because 1) quantifying PF and 2) measuring concentrations in PF are uneasy. PF is generated when the rainfall intensity exceeds microporosity hydraulic conductivity in the topsoil. When all micropores are filled with water, the excess of water fills the macropores thus generating PF (Jardine et al., 1990). PF chemistry is the result of rainfall chemistry, atmospheric dry deposition, canopy exchange and organic matter mineralization. Marques et al. (1996) showed that the chemistry of solutions collected with ZTL were mainly affected by organic matter mineralization in the forest floor and in the A horizon and underwent little interaction during their subsequent vertical transfer in the soil. As the tracing plot was not equipped with ZTL below 10 cm depth, ZTL concentrations at 10 cm depth were used to estimate the deuterium leaching flux due to PF. The mass balance computed for the MB(PF 3.5 mm·h⁻¹) scenario was very close to equilibrium (+3%). Deuterium concentrations in TCL show that the applied tracer had completely left the soil profile from February 2011 onwards. Furthermore, the mass balance computed for the MB(PF 3.5 mm·h⁻¹) scenario implies that preferential flow concentrations are likely to be similar to those of ZTL at 10 cm depth.

4.3. Comparing HYDRUS-1D and BILJOU

Both HYDRUS-1D and BILJOU were able to model both water flow and non-reactive solute transport processes at the Breuil-Chenue experimental site. Both models agreed on PF the RF intensity threshold above which PF was simulated (Table 4) and both models simulated very similar water drainage fluxes (Table 6). BILJOU and HYDRUS-1D model outputs were similar whatever the scenario considered. The simulated tracer elution peaks occurred at the same times (Table 4) and both models simulated very similar annual water drainage fluxes at the bottom of the soil profile (Table 6). Daily simulated water drainage fluxes differed between models ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.72$). BILJOU being a simple pool and flux model, drainage only occurs during rainfall events and soil layers do not, even temporally, retain water once field capacity is exceeded. However, when drainage was considered at a monthly time step, model water drainage outputs agreed ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.97$).

BILJOU is a much simpler model than HYDRUS-1D. Although BILJOU gives less insight on hydrological processes occurring in the soil than HYDRUS-1D, it also requires less and easily measured parameters. Furthermore, BILJOU's forest canopy module which generates TF and AET from RF and PET records is very robust (Granier et al., 1999). Finally, as soil solutions are most often sampled at a monthly time step, the monthly water drainage flux is sufficient. Our studies shows that BILJOU may be used to correctly model water flow and non-reactive solute transport in sandy forests soils.

4.4. Consequences on the nutrient drainage flux

Nutrient leaching is particularly sensitive to water flow. Modeling water flow is thus essential to compute precise input–output nutrient budgets (Ranger and Turpault, 1999). However, soil hydrology has not often been thoroughly studied when computing input–output budgets and the water drainage flux has often been estimated with hydrological models such as BILJOU calibrated only on soil water content data sets (Legout, 2008; Ranger et al., 2002; van der Heijden et al., 2011). Our study shows the importance of tracing experiments not only for better hydrological model calibration but also to study PF and its impact on nutrient leaching fluxes. To our knowledge, this study is the first to use artificially deuterated water as a water tracer to study forest soil hydrology and has proven to be a valuable tool. The only drawback in the use of deuterated water to trace water fluxes is that the isotopically enriched signature of the applied deuterated water is quickly diluted and transpired, and thus must be highly enriched for long-term (year) monitoring.

As the deuterium mass balance was at equilibrium when PF was considered (deuterium leaching flux due to PF estimated with 10 cm deep ZTL concentrations) (Fig. 4), the nutrient leaching flux due to PF was thus computed in the same manner. The nutrient leaching flux was highly increased by PF nutrient losses. The leaching flux over 2010 was 2.5, 1.7, 2.3 and 1.8 fold higher for Ca, Mg, NO₃ and Al (Table 5) while the total water drainage flux (matrix + preferential flow) remained very similar whether or not PF was taken into account (Table 6). Nutrient leaching mainly occurred during the winter period and the influence of PF was highest during such periods. Ca,

Table 6

Comparison of total annual water drainage fluxes (mm·year⁻¹) at 60 cm depth simulated by two hydrological models (HYDRUS-1D and BILJOU) from the different models: 100%RF and RF<X mm·h⁻¹. Scenarios are detailed in Table 2.

Year	100% RF mm·year ⁻¹	RF<2 mm·h ⁻¹ mm·year ⁻¹	RF<3.5 mm·h ⁻¹ mm·year ⁻¹	RF<5 mm·h ⁻¹ mm·year ⁻¹
2006	–38	–35	–37	–58
2007	–71	–13	–20	–47
2008	–46	2	–10	–9
2009	–14	–28	–16	–17
2010	–33	–13	–11	–10

Mg and Al leaching fluxes were mainly driven by the water drainage flux (Fig. 5) while the NO₃ leaching flux were more related to soil solution concentration.

However, ZTL concentrations may decrease with depth (Legout, 2008; Marques et al., 1996; Ranger et al., 2001) due to for example nutrient uptake, in particular because part of PF may occur along the root system. By using 10 cm depth ZTL concentrations, the nutrient leaching flux may be slightly overestimated. Furthermore, rapid water flow does not imply non-equilibrium flow. Rapid exchanges may occur along preferential flow paths thus changing the chemical composition of draining water. In base poor acidic soils, such as the soil at the Breuil-Chenue site, aluminum is a predominant cation and calcium and magnesium are present in very small quantities on the CEC. It is likely that part of the calcium and magnesium in rapid flow generated in the top soil (enriched due to litter decomposition) exchanges with aluminum on the CEC. If such exchanges occur along preferential flow paths, preferential flow could play an important role in the spatial variability of soil nutrients.

Nevertheless, nutrient leaching is likely to fall between the boundaries given by the two methods of nutrient leaching calculation. Particular attention should be given to water drainage fluxes during the beginning (March–April) and the end (September–October) of the vegetation season, when soil temperature is still high enough to allow for microbial activity, nutrient uptake by trees is reduced and soil water content increases to field capacity. Increased nutrient losses from the soil profile are of great interest for studying the sustainability of forest soil fertility and increased nitrate and aluminum out-fluxes are a threat to stream and river ecosystems (Dambrine et al., 1998; Guérolde et al., 2000). ZTL concentrations are generally collected at a monthly time step but PF concentrations are likely to vary widely depending on the rainfall intensity generating them and need to be studied at the event scale to better understand their chemistry.

5. Conclusion

Water flow in preferential pathways through the soil of a 30-year old beech experimental site was evidenced and quantified through two approaches: a water-tracing experiment using artificially deuterated water and two hydrological models (HYDRUS-1D and BILJOU). The two approaches proved to be complementary: preferential flow was brought to light through the tracing experiment and the modeling approach enabled to quantify preferential flow during the tracing experiment and during a 4-year monitoring period of soil water content. In this very acid soil, where nutrients are mostly concentrated close to the soil surface, this study shows that computed nutrient leaching fluxes may be largely under-estimated (up to 2.5 fold) when preferential flow is not taken into account. However this pattern may be quite different in richer soils, where large nutrient fluxes may be delivered by deep horizons. It is thus important when computing nutrient input–output budgets to properly calibrate hydrological models with both soil water content data sets and tracing experiments. While, yearly leaching fluxes give insight on change in soil fertility, a small time-scale is necessary to be able to study processes and relations between nutrients which govern soil solution composition in depth.

The simple pool and flux hydrological model BILJOU was proven to be as performing as the more sophisticated HYDRUS-1D for this sandy soils and a non-reactive solute transport module has been developed. However, BILJOU's ability to simulate solute transport would need to be validated on a variety of different soil types.

Acknowledgments

We would like to thank the following institutions: Région Lorraine and the European Fund for Regional Development (FEDER), GIPECOFOR and the Zone Atelier Moselle (ZAM) for funding the present study.

We are also grateful to Dr Granier and Dr Šimůnek for making respectively BILJOU and HYDRUS-1D available. Finally, we thank the PTEF (Plateau Technique d'Ecologie Fonctionnelle) for the deuterium isotope analysis.

References

- Allaire, S.E., Roullet, S., Cessna, A.J., 2009. Quantifying preferential flow in soils: a review of different techniques. *Journal of Hydrology* 378, 179–204.
- Augusto, L., Ranger, J., Binkley, D., Rothe, A., 2002. Impact of several common tree species of European temperate forests on soil fertility. *Annals of Forest Science* 59, 233–253.
- Aussenac, G., 1972. Etude de l'évapotranspiration réelle de quatre peuplements forestiers dans l'est de la France. *Annals of Forest Science* 29, 369–389.
- Aussenac, G., Boulangéat, C., 1980. Interception des précipitations et évapotranspiration réelle dans des peuplements de feuillu (*Fagus sylvatica* L.) et de résineux (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Annals of Forest Science* 37, 91–107.
- Becker, M.W., Coplen, T.B., 2001. Use of deuterated water as a conservative artificial groundwater tracer. *Hydrogeology Journal* 9, 512–516.
- Bormann, F.H., Likens, G.E., 1967. Nutrient cycling. *Science* 155, 424–429.
- Capriel, P., Beck, T., Borchert, H., Gronholz, J., Zachmann, G., 1995. Hydrophobicity of the organic matter in arable soils. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1453–1458.
- Dambrine, E., Thomas, A.L., Party, J.P., Probst, A., Boudot, J.P., Duc, M., Dupouey, J.L., Gégout, J.C., Guérolde, F., King, D., Landmann, G., Maitat, O., Nicolai, M., Pollier, B., Thimonier, A., 1998. Acidité des écosystèmes forestiers dans les Vosges gréseuses: distribution, évolution, rôle des dépôts atmosphériques et conséquences biologiques. *Compte rendu de l'Académie d'Agriculture Française* 84, 75–94.
- Deeks, L.K., Bengough, A.G., Stutter, M.I., Young, I.M., Zhang, X.X., 2008. Characterisation of flow paths and saturated conductivity in a soil block in relation to chloride breakthrough. *Journal of Hydrology* 348, 431–441.
- Edwards, W.M., Shipitalo, M.J., Dick, W.A., Owens, L.B., 1992. Rainfall intensity affects transport of water and chemicals through macropores in no-till soil. *Soil Science Society of America Journal* 56, 52–58.
- Ellsworth, P.Z., Williams, D.G., 2007. Hydrogen isotope fractionation during water uptake by woody xerophytes. *Plant and Soil* 291, 93–107.
- Feyen, H., Wunderli, H., Wydler, H., Papritz, A., 1999. A tracer experiment to study flow paths of water in a forest soil. *Journal of Hydrology* 225, 155–167.
- Ghodrati, M., Chendorain, M., Chang, Y.J., 1999. Characterization of macropore flow mechanisms in soil by means of a split macropore column. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1093–1101.
- Granier, A., Badeau, V., Bréda, N., 1995. Modélisation du bilan hydrique des peuplements forestiers. *Revue Forestière Française XLVN Special issue*, pp. 59–67.
- Granier, A., Bréda, N., Biron, P., Villette, S., 1999. A lumped water balance model to evaluate duration and intensity of drought constraints in forest stands. *Ecological Modelling* 116, 269–283.
- Guérolde, F., Boudot, J.-P., Jacquemin, G., Vein, D., Merlet, D., Rouiller, J., 2000. Macroinvertebrate community loss as a result of headwater stream acidification in the Vosges Mountains (N-E France). *Biodiversity & Conservation* 9 (6), 767–783.
- Jardine, P.M., Wilson, G.V., Luxmore, R.J., McCarthy, J.F., 1989. Transport of inorganic and natural organic tracers through an isolated pedon in a forest watershed. *Soil Science Society of America Journal* 53, 317–323.
- Jardine, P.M., Wilson, G.V., Luxmore, R.J., 1990. Unsaturated solute transport through a forest soil during rain storm events. *Geoderma* 46, 103–118.
- Jarvis, N.J., 2007. A review of non-equilibrium water flow and solute transport in soil macropores: principles, controlling factors and consequences for water quality. *European Journal of Soil Science* 58, 523–546.
- Koeniger, P., Leibundgut, C., Link, T., Marshall, J.D., 2010. Stable isotopes applied as water tracers in column and field studies. *Organic Geochemistry* 41, 31–40.
- Kohne, J.M., Kohne, S., Šimůnek, J., 2009. A review of model applications for structured soils: (a) water flow and tracer transport. *Journal of Contaminant Hydrology* 104, 4–35.
- Kreuzwieser, J., Gessler, A., 2010. Global climate change and tree nutrition: influence of water availability. *Tree Physiology* 30, 1221–1234.
- Kulmatiski, A., Beard, K.H., Verweij, R.J.T., February, E.C., 2010. A depth-controlled tracer technique measures vertical, horizontal and temporal patterns of water use by trees and grasses in a subtropical savanna. *New Phytologist* 188, 199–209.
- Kung, K.J.S., 1990. Preferential flow in a sandy vadose zone: 1. Field observation. *Geoderma* 46, 51–58.
- Langner, H.W., Gaber, H.M., Wraith, J.M., Huwe, B., Inskeep, W.P., 1999. Preferential flow through intact soil cores: effects of matric head. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1591–1598.
- Legout, A., 2008. Cycles Biogéochimiques et bilans de fertilité minérale en hêtraies de plaine. *Agroparistech-Engref, Nancy*, p. 281.
- Legout, A., Legout, C., Nys, C., Dambrine, E., 2009. Preferential flow and slow convective chloride transport through the soil of a forested landscape (Fougères, France). *Geoderma* 151, 179–190.
- Lennartz, B., Kamra, S.K., 1998. Temporal variability of solute transport under vadose zone conditions. *Hydrological Processes* 12, 1939–1949.
- Luxmoore, R.J., Jardine, P.M., Wilson, G.V., Jones, J.R., Zelazny, L.W., 1990. Physical and chemical controls of preferred path flow through a forested hillslope. *Geoderma* 46, 139–154.
- Mali, N., Urbanc, J., Leis, A., 2007. Tracing of water movement through the unsaturated zone of a coarse gravel aquifer by means of dye and deuterated water. *Environmental Geology* 51, 1401–1412.

- Maloszewski, P., Zuber, A., 1982. Determining the turnover time of groundwater systems with the aid of environmental tracers. *Journal of Hydrology* 57, 207–231.
- Maloszewski, P., Rauert, W., Trimborn, P., Herrmann, A., Rau, R., 1992. Isotope hydrological study of mean transit times in an alpine basin (Wimbachtal, Germany). *Journal of Hydrology* 140, 343–360.
- Marc, V., Robinson, M., 2004. Application of the deuterium tracing method for the estimation of tree sap flow and stand transpiration of a beech forest (*Fagus sylvatica* L.) in a mountainous Mediterranean region. *Journal of Hydrology* 285, 248–259.
- Marques, R., Ranger, J., Gelhaye, D., Pollier, B., Ponette, Q., Goedert, O., 1996. Comparison of chemical composition of soil solutions collected by zero-tension plate lysimeters with those from ceramic-cup lysimeters in a forest soil. *European Journal of Soil Science* 47, 407–417.
- McDonnell, J., 1990. A rationale for old water discharge through macropores in a steep humid catchment. *Water Resources Research* 26, 2821–2832.
- McDonnell, J., Rowe, L., Stewart, M., 1999. A combined tracer-hydrimetric approach to assess the effect of catchment scale on water flow path, source and age. Intergrated methods in catchment hydrology-Tracer, remote sensing and new hydrometric techniques (Proceedings of IUGG 99 symposium HS4), pp. 265–273 (IAHS Publ. no. 258, Birmingham).
- Meinzer, F.C., Brooks, J.R., Domec, J.C., Gartner, B.L., Warren, J.M., Woodruff, D.R., Bible, K., Shaw, D.C., 2006. Dynamics of water transport and storage in conifers studied with deuterium and heat tracing techniques. *Plant, Cell & Environment* 29, 105–114.
- Ptak, T., Piepenbrink, M., Martac, E., 2004. Tracer tests for the investigation of heterogeneous porous media flow and stochastic modelling of flow and transport – a review of some recent developments. *Journal of Hydrology* 294, 122–163.
- Ranger, J., Turpault, M.-P., 1999. Input–output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *Forest Ecology and Management* 122, 139–154.
- Ranger, J., Marques, R., Jussy, J.-H., 2001. Forest soil dynamics during stand development assessed by lysimeter and centrifuge solutions. *Forest Ecology and Management* 144, 129–145.
- Ranger, J., Allie, S., Gelhaye, D., Pollier, B., Turpault, M.P., Granier, A., 2002. Nutrient budgets for a rotation of a Douglas-fir plantation in the Beaujolais (France) based on a chronosequence study. *Forest Ecology and Management* 171, 3–16.
- Ranger, J., Andreux, F., Bienaimé, S., Berthelin, J., Bonnaud, P., Boudot, J.P., Bréchet, C., Buée, M., Calmet, J., Chaussod, R., Gelhaye, D., Gelhaye, L., Gérard, F., Jaffrain, J., Lejon, D., Le Tacon, F., Lévêque, J., Maurice, J., Merlet, D., Moukoumi, J., Munier-Lamy, C., Nourrisson, G., Pollier, B., Ranjard, L., Simonsson, M., Turpault, M.P., Vairielles, D., Zeller, B., 2004. Effet des substitutions d'essence sur le fonctionnement organo-minéral de l'écosystème forestier, sur les communautés microbiennes et sur la diversité des communautés fongiques mycorrhiziennes et saprophytes (cas du dispositif de Breuil-Morvan), Rapport final contrat INRA-GIP Ecofor 2001–24, No. INRA 1502A. INRA Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (UR 1138), 54280 Champenoux.
- Rawlins, B.G., Baird, A.J., Trudgill, S.T., Hornung, M., 1997. Absence of preferential flow in the percolating waters of a coniferous forest soil. *Hydrological Processes* 11, 575–585.
- Schar, C., Vidale, P.L., Luthi, D., Frei, C., Haberli, C., Liniger, M.A., Appenzeller, C., 2004. The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature* 427, 332–336.
- Seyfried, M.S., Rao, P.S.C., 1987. Solute transport in undisturbed columns of an aggregated tropical soil: preferential flow effects. *Soil Science Society of America Journal* 51, 1434–1444.
- Side, R.C., Tsuboyama, Y., Noguchi, S., Hosoda, I., Fujieda, M., Shimizu, T., 2000. Stromflow generation in steep forested headwaters: a linked hydrogeomorphic paradigm. *Hydrological Processes* 14, 369–385.
- Simon, T., 2007. Characterisation of soil organic matter in long-term fallow experiment with respect to the soil hydrophobicity and wettability. *Soil and Water Research* 2, 96–103.
- Simon, T., Javurek, M., Mikanova, O., Vach, M., 2009. The influence of tillage systems on soil organic matter and soil hydrophobicity. *Soil and Tillage Research* 105, 44–48.
- Simunek, J., Jarvis, N.J., van Genuchten, M.T., Gardenas, A., 2003. Review and comparison of models for describing non-equilibrium and preferential flow and transport in the vadose zone. *Journal of Hydrology* 272, 14–35.
- Šimůnek, J., Šejna, M., Saito, H., Sakai, M., van Genuchten, M.T., 2008. The Hydrus-1D software package for simulating the movement of water, heat, and multiple solutes in variably saturated media. Version 4.0, HYDRUS Software Series, 3. Department of Environmental Sciences, University of California Riverside, Riverside, California, USA, p. 315.
- Starr, M., 1999. WATBAL: a model for estimating monthly water balance components, including soil water fluxes. In: Kleemola, S., Forsius, M. (Eds.), 8th Annual Report 1999. UN ECE ICP Integrated Monitoring: The Finnish Environment (pp. 325:321–325).
- Stone, W.W., Wilson, J.T., 2006. Preferential flow estimates to an agricultural tile drain with implications for glyphosate transport. *Journal of Environmental Quality* 35, 1825–1835.
- Stumpp, C., Maloszewski, P., 2010. Quantification of preferential flow and flow heterogeneities in an unsaturated soil planted with different crops using the environmental isotope delta(18)O. *Journal of Hydrology* 394, 407–415.
- Tsuboyama, Y., Side, R.C., Noguchi, S., Hosoda, I., 1994. Flow and solute transport through the soil matrix and macropores of a hillslope segment. *Water Resources Research* 30, 879–890.
- Turton, D.J., Barnes, D.R., Navar, J.D., 1995. Old and new water in subsurface flow from a forest soil block. *Journal of Environmental Quality* 24, 139–146.
- Uchida, T., Kosugi, K., Mizuyama, T., 2001. Effects of pipeflow on hydrological process and its relation to landslide: a review of pipeflow studies in forested headwater catchments. *Hydrological Processes* 15, 2151–2174.
- van der Heijden, G., Legout, A., Nicolas, M., Ulrich, E., Johnson, D.W., Dambrine, E., 2011. Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change. *Forest Ecology and Management* 261, 730–740.
- Viville, D., Ladouche, B., Bariac, T., 2005. Isotope hydrological study of mean transit time in the granitic Strengbach catchment (Vosges massif, France): application of the FlowPC model with modified input function. *Hydrological Processes* 20, 1737–1751.
- Waddington, J.M., Roulet, N.T., Hill, A.R., 1993. Runoff mechanisms in a forested groundwater discharge wetland. *Journal of Hydrology* 147, 37–60.
- Williams, A.G., Dowd, J.F., Scholefield, D., Holden, N.M., Deeks, L.K., 2003. Preferential flow variability in a well-structured soil. *Soil Science Society of America Journal* 67, 1272–1281.
- Wilson, K.B., Hanson, P.J., Mulholland, P.J., Baldocchi, D.D., Wullschlegel, S.D., 2001. A comparison of methods for determining forest evapotranspiration and its components: sap-flow, soil water budget, eddy covariance and catchment water balance. *Agricultural and Forest Meteorology* 106, 153–168.

Annexe

Enrichissement isotopique en deutérium mesuré dans les solutions du sol collectées aux différentes profondeurs (0cm, 10cm, 15cm, 30cm et 60cm). Les enrichissements isotopiques sont exprimés en déviation (‰) par rapport au ratio isotopique de référence (SMOW). Les valeurs manquantes indiquent les dates pour lesquelles le volume collecté par le lysimètre était insuffisant pour l'analyse isotopique.

Date	Plaques lysimétriques (0cm)			Plaques lysimétriques (10cm)			Bougies poreuses (15cm)				Bougies poreuses (30cm)				Bougies poreuses (60cm)			
	Répétition			Répétition			Répétition				Répétition				Répétition			
	n°1	n°2	n°3	n°1	n°2	n°3	n°1	n°2	n°3	n°4	n°1	n°2	n°3	n°4	n°1	n°2	n°3	n°4
06/04/2010							-73.8	-65.8	-79.0	-78.2	-76.4		-81.4	-60.8	-56.6	-50.6	-51.9	-72.4
07/04/2010	20873.7	228.9	53444.0	24349.8	359.0		-70.9	-61.9	-66.9	-76.9	-77.1	-63.7	-76.5	-73.2				
08/04/2010	15287.4		10743.9	11665.7	7714.8	6987.3	-78.5	-65.3	-77.8	-79.0	-77.3	-61.6	-73.8	-62.8	-58.7	-52.9	-67.6	-66.6
09/04/2010													-66.9	-67.1	-64.5	-55.9	-71.6	-71.2
10/04/2010							-75.0	-64.7	-46.1	-54.9	-77.3	-66.3	895.8	-56.2	-62.5	-54.3	-69.5	-67.7
13/04/2010	2530.2	3786.7		11011.5	6484.3	7279.8	-62.1	-51.2	-73.3	-63.1	-65.7	-60.8	2447.9	-36.6	-64.8	-58.3	-71.8	-69.1
14/04/2010							-63.9	-38.2	336.5	-75.2	-58.8	-53.4	2391.9		-65.4	-60.0	-72.4	-67.7
20/04/2010	2530.2		7551.5	10577.5	5448.9	7516.0	1387.8	46.4	2575.9	-44.6	-50.0	-59.4	3089.5	-31.4	-65.1	-62.2	-74.0	-67.0
04/05/2010	5608.6	6567.5	1229.0		5087.2	7219.1	2011.5	241.7	681.3	2337.1	29.3	60.8	2600.4	-31.1	-70.7	-67.8	-70.4	-69.8
18/05/2010	5479.6	456.5	576.6	1659.6	1117.9	823.0	2823.8	792.3	1049.6	4134.8	427.7	267.9	1992.8	76.3	-71.7	-71.0	9.5	-69.2
15/06/2010	256.9	134.2	98.3	310.4	193.9	150.3	2370.1	1113.5	4398.2	3326.7	2191.6	544.9	638.6	821.3	-72.9	-65.8	190.8	-62.4
15/07/2010	34.9	15.6	21.2	32.1	24.0	25.6	945.4	452.1	3562.9	1214.4	1372.4	640.2	163.1	607.0	-39.5	-41.1	1102.1	-45.2
10/08/2010	10.2	5.0	2.4	12.0	-1.6	-3.2	644.9	353.1	2718.9	569.3	516.1	108.0		146.5	32.4	0.1	1537.9	-37.3
07/09/2010	2.2	-11.3			-20.7	-23.9	510.2		1367.6	573.6					47.1	14.0	1450.8	-34.0
04/10/2010	-16.4	-32.5	-20.6		-24.9	-28.9	143.0	406.3	608.9	520.5		656.3	-21.1	-5.0	41.0	11.7	1459.2	-37.6
04/11/2010	-30.3	-46.4	-38.7	-25.0	-26.1	-37.3	-0.3	11.3	311.7	81.2	303.5	429.6	-29.5	-31.3	196.8	13.1	1561.3	-22.7
07/12/2010	-34.2	-97.2		-76.8	-50.6	-86.0	-5.5	-30.9	467.0	29.0	81.5	201.0	-54.3	-35.5	516.3	234.7	1219.4	-5.5
03/01/2011	-43.3	-64.1		-69.4	-69.1	-68.2	-57.5	-75.9	-58.2	-46.4	28.5		-72.2					-25.5
25/01/2011	-39.0	-65.9	-26.8	-70.0	-77.6	-71.0	-62.1	-67.3	-81.8	-72.5	-7.8	-57.4	-80.6	-56.3	2.2	18.0	155.9	-60.6
22/02/2011			-46.3	-62.7	-71.8	-68.1	-66.4	-64.3	-77.2	-70.2	-68.7	-74.6	-81.0	-60.3	-36.3	-41.2	-59.7	-65.1
22/03/2011			-41.3	-62.9	-63.0	-62.1	-68.6	-56.2	-76.4	-72.7	-70.4	-75.2	-74.8	-64.2	-49.7	-57.6	-71.5	-71.5
19/04/2011	-55.8	-45.5	-45.5	-57.8	-54.8	-55.6	-62.6	-51.4	-71.0	-66.1	-68.9	-71.4	-60.0	-59.8	-54.4	-63.3	-73.8	-72.6



IV



Chapitre IV – Approches « conventionnelles » des cycles biogéochimiques et de l'évolution des réserves de Ca et Mg du sol dans la placette de hêtre

Ce chapitre présente une étude critique des méthodes conventionnelles d'études des cycles biogéochimiques du magnésium et du calcium dans la placette de hêtre, l'évolution des réserves de magnésium et de calcium du sol est étudiée (1) entre 1974 et 2001 par comparaison des stocks échangeables mesurés dans le sol et (2) entre 2003 et 2008 estimée avec des bilans de flux « entrées-sorties » et le suivi d'indicateurs de nutrition des arbres (concentrations foliaires et solutions de sol). Les limites de ces approches sont ensuite discutées.

I. Résumé de l'étude

I.1. Introduction

Comparés aux résineux, les peuplements de feuillus sont moins enclin à l'acidification des sols et des eaux parce que (1) les sols sous feuillus ont souvent de plus grandes réserves de cations échangeables, (2) l'effet « filtre » (captation des polluants atmosphériques) des feuillus est moins prononcé et (3) les vitesses de croissances des essences feuillues sont plus lentes et la sylviculture de ces peuplements est souvent moins intensive. Les études sur l'acidification des sols et des eaux dans les forêts de feuillus sont moins fréquentes et peu d'études ont estimé la capacité de ces écosystèmes à se restaurer naturellement.

Depuis les années 1980, une forte diminution des dépôts atmosphériques de soufre sur les écosystèmes forestiers a été observée en Europe. Les dépôts atmosphériques d'azote sont soit restés constants ou ont diminué. En conséquence, l'acidité des dépôts atmosphériques a diminuée. Une restauration naturelle au moins partielle des écosystèmes ayant subi une forte charge acide par le passé était attendue. Cependant, les dépôts atmosphériques de cations nutritifs ont aussi diminué. En conséquence, sur de nombreux sites à faible fertilité minérale, la restauration naturelle des sols et des eaux acidifiés n'a pas été observée. Certaines études ont même mis en évidence des processus d'acidification qui perdurent encore aujourd'hui.

En France et en Europe, les politiques forestières encouragent de plus en plus une intensification des pratiques (Ericsson 2004; FAO 2010; Mantau et al. 2010; Puech 2009). Cependant, de nombreuses études ont suggéré que l'augmentation de l'exportation de biomasse (exploitation des rémanents) (Aherne et al. 2008; Akelsson et al. 2007) ou l'augmentation de la croissance forestière (Belanger et al. 2004; Huntington 2005) pourraient à terme engendrer des pertes en cations nutritifs échangeables du sol et des réductions de croissance forestière (Holmqvist 2001; van der Heijden et al. 2011; Zaccherio and Finzi 2007).

Quantifier l'évolution des réserves en nutriments du sol avec le temps et déceler les causes de ces changements est difficile mais primordiale pour déterminer la durabilité de la fertilité chimique des sols forestiers et préconiser des interventions anthropiques efficaces et adaptées aux capacités et contraintes de l'écosystème. Il existe plusieurs manières de mesurer ou estimer l'évolution des réserves en nutriments du sol : (1) comparaison des réserves à deux dates différentes par prélèvements de sol, (2) calcul des bilans de flux « entrées-sorties » ou modélisation des cycles biogéochimiques et (3) suivi d'indicateurs de la nutrition des arbres (concentration foliaire ou composition chimique des solutions de sol).

Les objectifs de ce chapitre sont (1) d'étudier les évolutions des réserves de cations échangeables entre 1974 et 2008, (2) discuter les différentes causes potentielles à ces évolutions, (3) discuter les limites des approches conventionnelles et (4) discuter des processus du fonctionnement minérale de cet écosystème alors que les réserves de nutriments du sol sont très faibles

I.2. Principaux résultats

I.2.1. Evolution des réserves de Mg et Ca du sol entre 1974 et 2001

Les réserves échangeables en magnésium et en calcium du sol ont été mesurées en 1974 avant plantation et en 2001. Bien que les méthodes d'échantillonnage et d'extractions entre les deux dates diffèrent, cette comparaison a permis de mettre en évidence les grandes tendances d'évolutions. Les réserves en magnésium échangeable ont dramatiquement diminuées entre 1974 et 2001 ($\sim 5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). Cette diminution s'est répartie sur l'ensemble du profil de sol. Cette diminution des réserves en Mg est en partie expliquée par l'immobilisation de magnésium dans la biomasse aérienne et l'humus sur la période 74-01 ($\sim 1.3 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). Les pertes de magnésium restant inexplicées ($\sim 3.7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) sont probablement due à des pertes par drainage liées à :

- (1) Un flux de drainage de sulfate plus élevé sur la période 1974-2001 lié à des dépôts atmosphériques de soufre plus élevés.
- (2) La coupe à blanc du peuplement en 1975 qui a pu entraîner une minéralisation accrue de la matière organique, une production importante de nitrate (sans consommation) et un drainage de magnésium avec le nitrate comme anion vecteur.

En moyenne entre 1974 et 2001, les réserves de Ca ont diminué de $\sim 1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$. Cependant, cette diminution n'était pas significative puisqu'inférieure à la variabilité spatiale des réserves aux deux dates. La stabilité des réserves échangeables de Ca au cours de la période 1974-2001 est surprenante vu les pertes en magnésium, l'important flux d'immobilisation de Ca dans la biomasse aérienne ($\sim 5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) et l'humus ($\sim 1.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). Il est possible que les pertes en Ca aient été compensées par des dépôts atmosphériques de Ca plus élevés ($> 8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ en moyenne entre 1974 et 2001).

La comparaison des réserves à deux dates différentes par prélèvements de sol est la seule manière de mesurer directement une évolution. Cependant, il est difficile de démontrer statistiquement ces évolutions puisqu'elles sont souvent inférieures à la variabilité spatiale des réserves du sol. Lorsque cette évolution est statistiquement significative, elle ne permet néanmoins pas d'identifier les causes de cette évolution.

I.2.2. Bilans de flux « entrées-sorties » sur la période 2003-2008

Les bilans de flux « entrées-sorties » calculés sur la période 2003-2008 ont permis de mettre en évidence un flux de désorption de sulfate au sein du profil de sol. En effet, les bilans de flux « entrées-sorties » indiquent une perte nette de soufre ($4.9 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). Ce flux de désorption est probablement lié à la diminution des dépôts atmosphériques de soufre depuis les années 1990s. Ce flux de désorption de sulfate maintient un flux de drainage en calcium et en magnésium.

Les résultats des bilans de flux « entrées-sorties » sont les suivants : $-3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ pour le calcium et $-0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ pour le magnésium. L'immobilisation annuelle dans la biomasse aérienne représente le plus important flux de Mg et de Ca parmi les termes du bilan. Les cycles du calcium et du magnésium diffèrent. En effet, tandis que les dépôts atmosphériques sont la

principale entrée de calcium à l'écosystème, le flux d'altération et les dépôts atmosphériques de magnésium sont équivalents.

Les bilans de flux « entrées-sorties » permettent de mettre en évidence l'importance relative de chaque flux dans les cycles biogéochimiques. La mesure des différents flux et l'estimation de l'incertitude autour de chacun des flux est cependant très complexe. En conséquence, il est virtuellement impossible de connaître l'incertitude autour des bilans de fertilité minérale. A cela s'ajoute la difficulté de valider les bilans de flux « entrées-sorties » du fait de la difficulté de mesurer les évolutions de réserves en nutriments du sol.

I.2.3. Cycles biogéochimiques du Mg et du Ca dans le peuplement de hêtre

Le calcul des flux d'éléments minéraux au sein de l'écosystème montre l'importance du cycle biologique : prélèvement dans le sol, chute de litière et décomposition de la litière au sol. En effet, l'humus est une importante source de magnésium et de calcium dans l'écosystème avec des stocks totaux représentant respectivement 38% et 90% des réserves échangeables du sol. Le cycle biologique du magnésium et du calcium est aussi rapide : la chute de litière renouvelle 4.9 % \cdot an⁻¹ et 17.2 % \cdot an⁻¹ respectivement des réserves échangeables du sol.

Les réserves en magnésium et en calcium du sol sont très faibles et en baisse mais la fertilité chimique du sol semble assurée par un cycle biologique « rapide » et conservatif.

II. Assessing Mg and Ca depletion from broadleaf forest soils and potential causes - A case study in the Morvan mountains

Gregory van der Heijden^{(1)*}, Arnaud Legout⁽¹⁾, Benoît Pollier⁽¹⁾, Louis Mareschal⁽²⁾,
Marie-Pierre Turpault⁽¹⁾, Jacques Ranger⁽¹⁾, Etienne Dambrine⁽³⁾

Article accepté pour publication dans Forest Ecology and Management 10 novembre 2012

(1) INRA – UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes forestiers, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France

(2) CIRAD – UMR 210 Ecologie Fonctionnelle et biogéochimie des sols et des agrosystèmes, Bâtiment 12, 2 Place Viala, 34060 Montpellier cedex 2

(3) INRA – UMR 042 CARTELE, Université de Savoie, Centre Interdisciplinaire Scientifique de la Montagne, Belledonne 226, 73376 Le Bourget-du-Lac Cedex

*Corresponding author

Tel : 03 83 39 73 27

Fax : 03 83 39 40 76

gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr



Assessing Mg and Ca depletion from broadleaf forest soils and potential causes – A case study in the Morvan Mountains

Gregory van der Heijden^{a,*}, Arnaud Legout^a, Benoît Pollier^a, Louis Mareschal^b, Marie-Pierre Turpault^a, Jacques Ranger^a, Etienne Dambrine^c

^aUnité Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, INRA de Nancy, Route d'Amance, 54 280 Champenoux, France

^bCIRAD, UMR ECOSOL, 34060 Montpellier, France

^cINRA-Université de Savoie, UMR CARTELE, 73376 Le Bourget du Lac, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2012

Received in revised form 21 December 2012

Accepted 29 December 2012

Keywords:

Calcium

Magnesium

Soil fertility

Input–output nutrient budgets

Ecosystem sustainability

Nutrient cycling

ABSTRACT

Compared to conifers, broadleaf forests are less prone to soil and water acidification, because (1) they often have soils with larger exchangeable base cation pools, (2) the pollution scavenging capacity of deciduous trees is lower, and (3) they grow more slowly and are often less intensively managed. Since the 1980s, atmospheric deposition acidity has strongly decreased in forest ecosystems, so that the present acidification status of broadleaf forests should be improving. We used a 35 year-old beech plot in the Morvan Mountains (Burgundy, France) to question past and present acidification processes in broadleaf ecosystems.

Soil exchangeable Mg, Ca and K pools measured from samples collected in 1974 and 2001 were compared and input–output budgets were computed over the 2003–2008 period. The objectives were (i) to assess Mg and Ca pool size changes over 1974–2008, (ii) to discuss the potential causes of these changes and, (iii) discuss the limits of conventional methods to study nutrient pool size changes (soil data comparison and nutrient budgets).

Soil exchangeable Mg pools decreased during the 1974–2001 period while Ca and K pools remained constant, and very small. Soil solution monitoring and input–output budgets over the 2003–2008 period suggested an ongoing loss of exchangeable Ca and Mg, partly due to the desorption of sulphate from the soil which induced Mg, Ca and K depletion. Given the very low concentration in exchangeable base cations, and assuming no change in soil spatial variability, we computed that resampling soils at 10 years intervals may not unequivocally demonstrate a gain/loss of exchangeable base cations. Foliar Mg concentrations were continuously below the deficiency level, K and N concentrations decreased but Ca did not.

From this, we discuss the validity/limits of the different approaches used, how the ecosystem can cope with such low levels of nutrients, and the fluxes and processes within the ecosystem that should be investigated in this perspective.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Forests contribute to soil and surface water acidification in areas of high acid deposition due to the enhanced canopy capture of atmospheric pollutants ('the scavenging effect') (Nisbet et al., 1995) especially by dry and occult deposition, as a result of increased turbulent air mixing (Fowler et al., 1989). Another factor is the accumulation and removal of base cations in harvested trees. Compared to conifer, broadleaved forests are less prone to soil and water acidification because (1) they often have soils with larger

exchangeable base cation pools (Fichter et al., 1998; Augusto et al., 2002; Mareschal et al., 2010), (2) the pollution scavenging capacity of deciduous trees is lower (De Schrijver et al., 2007; Berger et al., 2009), and (3) they grow more slowly and are often less intensively managed. However, broadleaved forests may be prone to other acidifying processes. For instance, compared to conifer, nitrate concentration in soil solutions has been shown to be higher under broadleaved forests (Kristensen et al., 2004). Reports on soil and stream acidification in broadleaf forest are much less frequent although cited (Falkengren-Grerup and Tyler, 1991; Thimonier et al., 2000).

Since the 1980s, deposition rates of sulphur on terrestrial ecosystems have strongly decreased in Europe (Barrett et al., 2000; Vuorenmaa, 2004; Cooper, 2005; Boxman et al., 2008; Meesenburg et al., 2009) and in North America (Likens et al., 2001; Boucher and Pham, 2002). Nitrate and ammonium deposition has either re-

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)8 83 39 73 27; fax: +33 (0)8 83 39 40 76.

E-mail addresses: gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr (G. van der Heijden), legout@nancy.inra.fr (A. Legout), pollier@nancy.inra.fr (B. Pollier), louis.mareschal@cirad.fr (L. Mareschal), turpault@nancy.inra.fr (M.-P. Turpault), ranger@nancy.inra.fr (J. Ranger), dambrine@nancy.inra.fr (E. Dambrine).

mained stable (Cooper, 2005) or has decreased (Vuorenmaa, 2004; Meesenburg et al., 2009). As a consequence, atmospheric deposition acidity has strongly decreased in forest ecosystems. However, deposition of base cation has also decreased (Likens et al., 1996; Vuorenmaa, 2004). Consequently, soil and stream water acidification recovery has been slow or has not yet been observed at many monitoring sites (Stoddard et al., 1999; Jandl et al., 2004; Sverdrup et al., 2006; Warby et al., 2007; van der Heijden et al., 2011). Some studies have even reported an on-going acidification (Watmough and Dillon, 2003; Warby et al., 2007; Reiningger et al., 2011; van der Heijden et al., 2011). Beech and oak coppices of central France have been used for centuries for fuel wood, charcoal, pig livestock and litter-racking which have substantially impoverished their soils and could partly explain slow or inexistent recovery.

Furthermore, the increasing demand for bio-energy encourages intensified forest practices such as shorter rotations and whole-tree harvesting. Forest biomass utilization is to be increased throughout Europe (Ericsson, 2004; Puech, 2009). Forest ecosystem monitoring networks have been set up in Europe (ICP Forests) in order to assess the impact of acid rain on forests but do not enable to assess the impact of silvicultural practices.

Studying soil nutrient pool size change over time is challenging. On the one hand, soil acidification or recovery may be studied (1) by soil resampling and comparison with former values. The difficulty lies in detecting small changes in pools with large spatial variability. On the other hand, acidification or recovery trends may be studied (2) by monitoring, modeling fluxes and/or computing input–output nutrient budgets (Bormann and Likens, 1967; Ranger and Turpault, 1999). The difficulties are linked to the quantification of many unknown fluxes, especially within the ecosystem. The poorly understood relations between nutrient availability and forest nutrition illustrates this (Jandl et al., 2004; Miller and Watmough, 2009), as well as the debate about Al toxicity (Cronan and Grigal, 1995; Schöll et al., 2004; de Wit et al., 2010).

Both methods (1 and 2) are currently used in many European countries. Because of these unknowns, discrepancies have been observed between predictions based on flux monitoring and measured soil chemical changes (Johnson et al., 1997; Johnson and Todd, 1998; Likens et al., 1998; Yanai et al., 2005; McLaughlin and Phillips, 2006; Hazlett et al., 2011; McLaughlin et al., 2011; van der Heijden et al., 2011).

This study focuses on the Breuil-Chenué experimental site (see description below) which was set up in 1974 on poor soils in the Morvan Mountains (France): the native forest was clear-cut, swathing (removal of all brash and organic layer from the plot) was carried out and different tree species were planted (monospecific plantations), including beech (*Fagus sylvatica* L.). Forest plantations represent an important proportion of French forests and although some benefits of these practices may be highlighted, these plantations may also cause enhanced nutrient depletion from the soil (e.g. Berthrong et al., 2009).

The objectives of the present study focusing on the beech plantation at the Breuil-Chenué site were (1) to assess Mg and Ca pool size changes over the 1974–2008 period, (2) to discuss the potential causes to these changes, (3) discuss the limits of conventional methods to study nutrient pool size changes (soil data comparison and nutrient budgets), and (4) discuss how the ecosystem may cope with such low levels of nutrients.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The experimental site of Breuil-Chenué forest (hereafter named Breuil-Chenué site) is located in the Morvan Mountains, Burgundy,

France (latitude 47°18'10", longitude 4°4'44"). The elevation is 640 m, the annual rainfall 1180 mm, the mean annual potential evapo-transpiration (PET) 750 mm and the mean annual temperature 9 °C (computed over the period 2006–2010). The soil is a sandy Alocrisol (Alumic Cambisol; WRB FAO) displaying micro-podzolisation features in the upper mineral horizon (Ranger et al., 2004). The soil parent material is granite, containing 23.5% quartz, 44% K-feldspar, 28.5% plagioclase, 1.6% biotite and 1.6% muscovite (Seddoh, 1973). Total element analysis of the deep soil layer and the parent material is presented in Table 1.

In 1975, part of the native forest (coppice with standards) located on a homogeneous soil type was clear-cut, heaving swathing was carried out (common practice in the 1970s to facilitate plantations): all brash and the humus layer were removed from the plot with a forest bulldozer. Plots covering 1000 m² were planted with different species in 1976. A plot of native forest was left un-cut (Fig. 1).

The present study focused on the beech plot (*Fagus sylvatica* L.). The humus type in this plot differed from the native forest and was described as a mesomull with thin L and F layers (Moukoui, 2006). A thinning was carried out in 2002 and all above-ground organs of felled trees were removed from the plot. Soil chemical properties were measured from 16 soil profiles (0–70 cm depth) collected in 2001. A description of soil properties is given in Table 2. Total available soil nutrient pools computed for the 0–70 cm soil layer were small (Table 3) most especially for magnesium and calcium: 33 kg ha⁻¹ Mg and 61 kg ha⁻¹ Ca. The highest concentrations of exchangeable base cations were found in the topsoil (0–15 cm) (Table 2). Soil total Ca concentrations were below the detection limit (0.02%) for all soil layers meaning that the release of Ca by mineral weathering is probably very small.

2.2. Data collection

As described above, the Breuil-Chenué site has been monitored since 1974. Soil was sampled in 1974 and in 2001 (as detailed below). Between 2003 and 2008, the site was monitored to compute input (atmospheric deposition and weathering) and output (net uptake and leaching) fluxes of nutrients. A summary of sampling and monitoring carried out is given in Fig. 2.

2.2.1. Soil and humus data

In 1974 prior to the clear-cut, 8 soil profiles were sampled the localization of which is given in Fig. 1. Soil samples were sieved (2 mm) and air-dried before analysis. Soil exchangeable cations were extracted with two consecutive 1 h-long extractions using ammonium acetate (1 mol L⁻¹). Sample Mg, Ca and K concentrations were analysed by atomic absorption. Soil carbon content was analysed by loss on ignition.

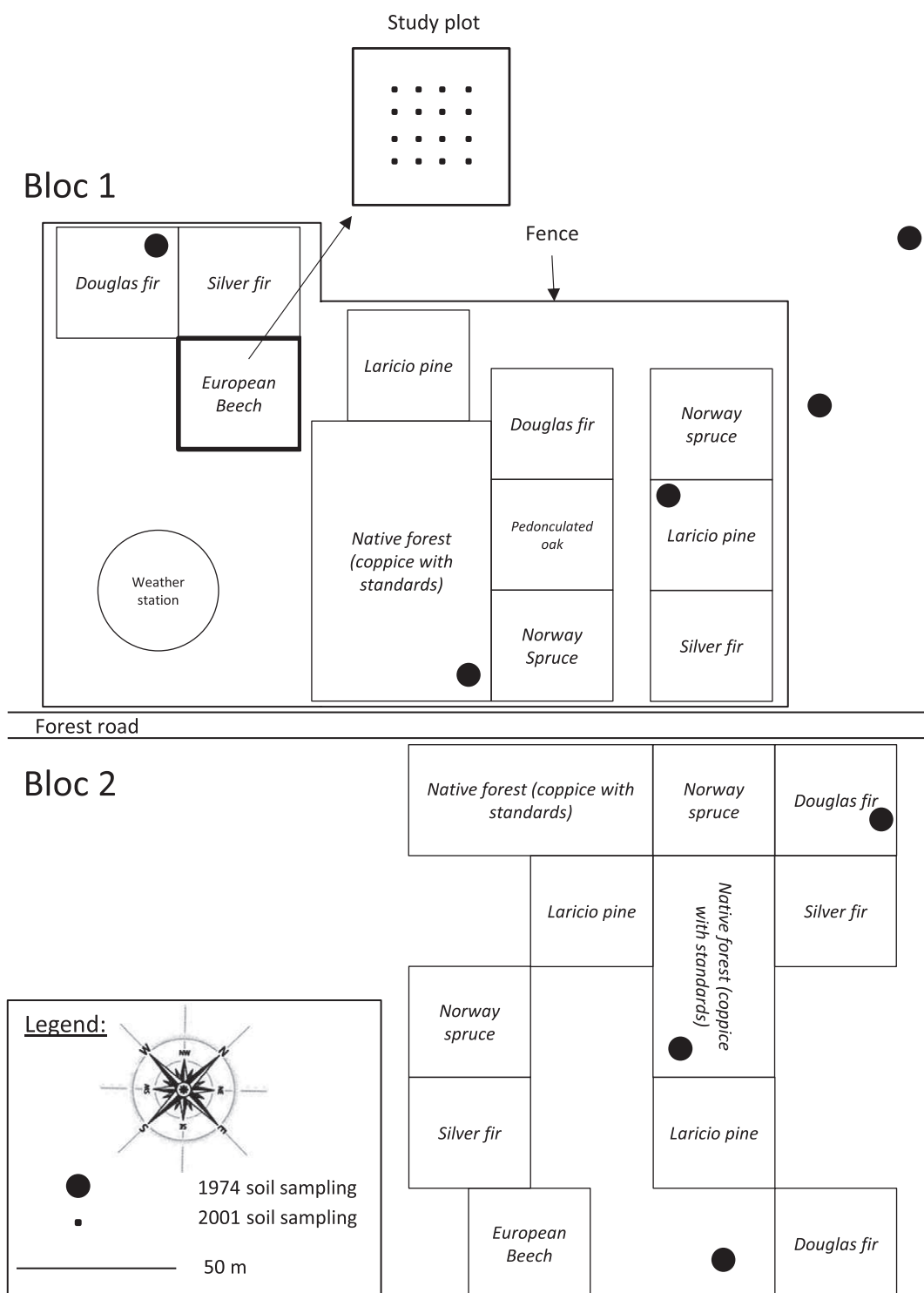
In 2001, 16 soil profiles were sampled in the beech plot (Fig. 3). Soil samples were sieved (2 mm) and air-dried before analysis. Fine earth bulk density and soil granulometric distribution was measured. Fine earth total analysis was carried out and fine earth mineralogy was determined by X-ray (Siemens D5000) after digestion of the organic fraction by hydrogen peroxide and separation of the granulometric fractions (Mareschal, 2008). Soil exchangeable cations were extracted with two consecutive 1 h-long extractions using KCl (1 mol L⁻¹) for Al and NH₄Cl (1 mol L⁻¹) for base cations. Sample Mg, Ca and K concentrations were analysed by ICP-AES (Jobin-Yvon 180 Ultrace). Soil extractable P was measured (Duchaufour and Bonneau, 1959). Soil carbon and nitrogen content was analysed with an elementary analysis system (Thermo Quest NCS 2500).

Humus samples (16 replicates) were collected in 2001 using 16.5 × 10.5 × 7.5 cm frames. Humus dry mass (g m⁻²) was measured for all 16 replicates. Nutrient content was measured for 8

Table 1

Total element analysis (%) of the deep soil horizon and the “Pierre-qui-vire” granite bedrock (Dejou et al., 1977).

	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅
Deep soil (70–90 cm)	67.32	21.82	2.86	0.10	0.42	<0.02	1.54	4.90	0.31	0.10
Granite	73.25	14.58	2.42	0.04	0.20	0.60	3.20	4.31	0.20	0.11

**Fig. 1.** Map of the Breuil-Chenué experimental site: localization of the different stands and soil samplings in 1974 and in 2001.

replicates: C and N content was measured (Thermo Quest NCS 2500); P, Mg, Ca and K content was determined by ICP-AES after sample digestion with 50% nitric acid.

2.2.2. Solution monitoring and analysis

The Breuil-Chenué site was equipped during 2001 and 2002. An automatic weather station situated at the site recorded daily rain-

Table 2
Breuil-Chenu experimental site soil description. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2 mm diameter (mass of soil particles smaller than 2 mm/total volume of soil). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC).

Horizon	Depth (cm)	Bulk density (0 < 2 mm)	C (g kg ⁻¹)	C/N	Soil texture			Soil cationic exchange capacity						
					Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	ECEC (cmolc kg ⁻¹)	BS (%)	Mg (cmolc kg ⁻¹)	Ca (cmolc kg ⁻¹)	K (cmolc kg ⁻¹)	Al (cmolc kg ⁻¹)	H (cmolc kg ⁻¹)
A1/E	0–5	0.50	72.6	18.0	57.6	21.8	20.6	8.66	19.44	0.23	0.54	0.37	6.30	0.83
A1-A1/Bp	5–10	0.64	46.1	18.1	60.2	21.5	18.4	7.23	10.88	0.13	0.15	0.22	6.05	0.42
Sail 1	10–15	0.67	34.2	18.1	58.0	23.6	18.4	5.43	7.88	0.08	0.07	0.14	4.85	0.18
Sal 2	15–25	0.89	23.3	17.9	60.0	24.1	16.0	4.08	5.75	0.04	0.02	0.10	3.79	0.12
Sal 2	25–40	0.90	14.0	17.1	57.8	24.7	17.5	3.13	7.38	0.03	0.02	0.08	2.73	0.09
Sal 3	40–55	1.08			55.7	25.8	18.5	3.11	8.06	0.02	0.01	0.09	2.62	0.08
II Sal 4	55–70	1.05			57.3	25.3	17.5	3.32	8.06	0.03	0.02	0.09	2.80	0.10

Table 3
Available and total nutrient pool sizes in the beech plot at the Breuil-Chenu site. Available pools were estimated from soil extraction data (Duchaufour for P and soil CEC extractions for base cations Mg, Ca and K). Total nutrient pools were estimated from soil total analysis. Nutrient pools in above-ground biomass were estimated with the mineralmass equations applied to the 2001 beech plot inventory and humus pools were estimated from total analysis of humus samples (Moukoui, 2006). All pools are expressed in kg ha⁻¹.

Compartment/soil horizon	Depth (cm)	Available pools				Total pools				
		P (kg ha ⁻¹)	Mg (kg ha ⁻¹)	Ca (kg ha ⁻¹)	K (kg ha ⁻¹)	N (kg ha ⁻¹)	P (kg ha ⁻¹)	Mg (kg ha ⁻¹)	Ca (kg ha ⁻¹)	K (kg ha ⁻¹)
Above ground biomass						324	27	25	148	193
Organic layer						307	14	12	55	27
A1/E	0–5	17 (6)	7 (2)	27 (7)	36 (10)	1008	57	409	<53	11,133
A1-A1/Bp	5–10	15 (3)	5 (2)	10 (7)	27 (5)	820	70	570	<69	15,168
Sal 1	10–15	14 (3)	3 (1)	5 (4)	19 (6)	635	69	663	<76	17,562
Sal 2	15–25	43 (35)	5 (1)	4 (4)	34 (15)	1155	174	2907	<181	40,515
Sal 2	25–40	54 (13)	5 (3)	5 (10)	40 (12)	1097	308	4109	<259	58,727
Sal 3	40–55	17 (32)	4 (1)	3 (3)	55 (20)		337	5671	<312	71,395
II Sal 4	55–70	19 (34)	5 (6)	7 (14)	54 (26)		310	5714	<320	74,116
	0–70	180 (81)	33 (8)	61 (28)	265 (72)	4714	1326	20,043	<1274	28,8614

fall and potential evapotranspiration (Penmann-Monteith formula). Bulk precipitation was collected with a PEHD bucket in a clearing 500 m from the Breuil-Chenu site and with a funnel at the top of the weather station antenna. Throughfall was collected with four two-metre-long PEHD gutters covering in total 1.55 m². Soil solutions were collected with ceramic tension-cup lysimeters (TCL; Oikos Umweltanalytik GBR, Ceramic P80, porosity 45 μm, alumina-silica), with an applied pressure of 0.5 bars, at 15, 30 and 60 cm depth (5 replicates/depth). Samples were collected every 28 days from 2002 to 2008, stored at 4 °C and analysed for all major elements (S, P, Ca, Mg, K and Na) (ICP-AES, Jobin Yvon Ultra-trace 180) and major anions (NO₃⁻, Cl⁻) and NH₄⁺ by molecular absorption spectrometry (SKALAR).

High concentrations in solution samples (rainfall, throughfall and stemflow) may be due to a contamination (faeces or dead animals/insects) and thus need to be deleted from the data base. A model was designed to highlight such outliers: concentrations higher than the criteria C were considered as abnormally high:

$$C_{x,y} = Q_{x,y}(75\%) + IQ_{x,y}$$

where $C_{x,y}$ is the criteria above which concentrations of element x are considered abnormally high in solution type y , $Q_{x,y}(75\%)$ is the 75% quantile of element x in solution type y and $IQ_{x,y}$ is the interquartile of element x in solution type y . Samples with jointly abnormally high C, N, P and S concentrations were considered as contaminated and all concentrations in these samples were considered as outliers. All abnormally high concentrations were also considered as outliers.

Missing values in data base (no sample collected or deleted outlier) were predicted with a statistical gap filling model:

$$[X]_{predicted}(t) = t \times [X]_{monthly\ mean}(t) + b \times [X](t-1) + t \times [X](t+1)$$

where $[X]_{predicted}(t)$ is the predicted concentration of element X at time step t , $[X]_{monthly\ mean}(t)$ is the monthly mean concentration of element X over the entire period (2003–2008) at time step t , $[X](t-1)$ and $[X](t+1)$ are concentrations of elements X at time step $t-1$ and $t+1$, finally a , b and c are adjusted parameters for each element and each solution type. Parameters were adjusted with a bootstrap method as follows. Parameters were adjusted on 100 subsets representing 90% of the total population (individuals were selected randomly but each subset represented equally each season), mean errors and root mean square errors were calculated by comparing predicted to measured concentrations in the 10% subsets. Final parameters were calculated as the mean value of the 100 adjusted parameters.

Data from a nearby (24 km) monitoring site (RENECOFOR – DOU71) part of the ICP Forest European monitoring network was used to assess atmospheric deposition change in the 1990s. The monitoring plot was installed in a Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb.) stand at a similar elevation (650 m) in 1992. Bulk rainfall and throughfall chemistry were collected weekly from 1993 to 2007. Solutions were analysed for Mg and Ca by ICP-AES and sulphate by ionic chromatography.

2.2.3. Biomass data

Nutrient pools in above-ground tree organs (mineralmass) were determined following a procedure based on the method described by Sattoo and Madgwick (1982) applied in numerous studies (Alban et al., 1978; Ranger et al., 1995; Saint-André et al., 2005; Sicard et al., 2006; van der Heijden et al., 2011). It consisted of (i) stand inventories every year from 2001 to 2007 (all trees in the beech

plot were measured in circumference at breast height, $Circ_{1.30}$), (ii) a destructive sampling of trees distributed over the whole spectrum of inventoried $Circ_{1.30}$ classes, (iii) fitting total above-ground mineralmass allometric equations (as described below), and (iv) the quantification of the stand biomass and nutrient content on a per hectare basis by applying the fitted equations to each stand inventory.

During the thinning in 2002, 12 felled beech trees were sampled. The investigated compartments were bole and branches. Total fresh biomass was weighed on site after the felling. Aliquots of each compartment were sampled to determine the water content (conversion to dry matter) and nutrient concentrations. Mineralmass allometric equations were fitted for each element to the data (Online resource 1):

$$Mineralmass = a \times Circ_{1.3}^b$$

where a and b are the adjusted parameter for the element and $Circ_{1.3}$ the measured circumference at breast height.

Litterfall was collected every 3 months from 2001 to 2007 with 5 collectors covering in total 2.5 m². Green leaves were sampled from 2002 to 2007 in August. All vegetation samples (bole, branches, litterfall and green leaves) were oven-dried (65 °C) and weighed, then milled and digested with 50% nitric acid. Samples were analysed for all major elements: S, P, Ca, Mg and K (ICP-AES, Jobin Yvon Ultrac 180), total C and total N (ThermoQuest NCS 2500). Foliar concentrations were standardized by the deficiency level for each nutrient defined by Bonneau (1995), values below 1 indicate deficiencies for the given nutrient.

2.3. Nutrient fluxes and input–output budget calculation

2.3.1. Nutrient budget principle

Nutrient budgets are a very widely used tool to estimate nutrient pool size change over time. Here we applied the same calculation methodology that has been applied in many other studies (Bormann and Likens, 1967; Likens et al., 1977; Fichter et al., 1998; Ranger and Turpault, 1999; Laclau et al., 2005; Sverdrup et al., 2006; Akelsson et al., 2007). Nutrient fluxes and input–output budgets were computed over the 2003–2008 monitoring period using conventional approaches. Input–output nutrient budgets are computed as the difference between inputs and outputs to the system. Generally at the forest plot scale, with no slope, it suffices to take into account the following factors (Ranger and Turpault, 1999):

$$B(X) = AD(X) + W(X) - U(X) - L(X)$$

where $B(X)$ is the annual input–output budget of element X , $AD(X)$ is total annual atmospheric (dry and wet) deposition of element X , $W(X)$ is the weathering flux of element X , $U(X)$ is the net uptake flux of element X and $L(X)$ is the leaching flux at 60 cm depth of element X . All fluxes and budgets are expressed in kg ha⁻¹ yr⁻¹

2.3.2. Atmospheric deposition

Atmospheric wet deposition was computed for all elements as the mean deposition in bulk rainfall measured at the weather station antenna and the nearby clearing. Atmospheric dry deposition was estimated using the equations defined by Ulrich (1983). We

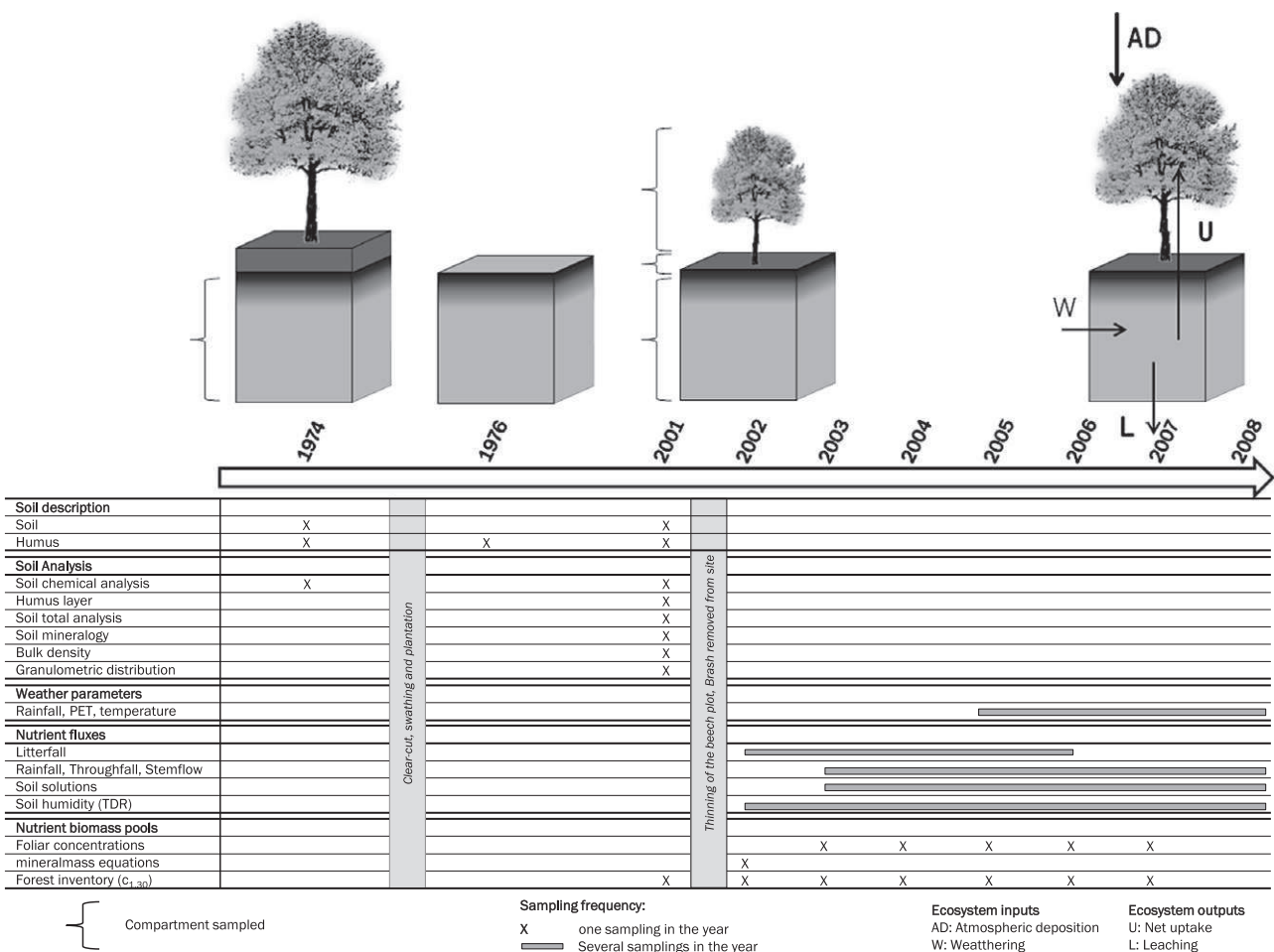


Fig. 2. A schematic description of silvicultural operations and sampling in the beech plot from 1974 to 2008.

assumed no Na^+ canopy interaction and computed dry Na deposition as the difference between bulk rainfall and throughfall plus stemflow. Dry deposition of cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ and NH_4^+) was then computed using the Na dry deposition factor:

$$\text{Dry}(X) = \frac{\text{Dry}(\text{Na})}{\text{Wet}(\text{Na})} \times 100$$

where $\text{Dry}(X)$ is the dry deposition of cation X , $\text{Dry}(\text{Na})$ the Na dry deposition, $\text{Wet}(\text{Na})$ the Na wet deposition and $\text{Wet}(X)$ the wet deposition of cation X . Anion (NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} and Cl^-) dry deposition was computed from the difference between wet deposition and (throughfall + stemflow) fluxes. If the computed values were negative, dry deposition was set nil.

2.3.3. Weathering flux

We used the geochemical model PROFILE (Sverdrup and Warfvinge, 1988) to calculate the mean annual input. The PROFILE model is one of the most common approaches to estimate weathering fluxes in forest ecosystems (Fichter et al., 1998; Sverdrup and Rosen, 1998; Akselsson et al., 2005; Watmough et al., 2005; van der Heijden et al., 2011) and has been widely used to estimate acid critical loads (Warfvinge and Sverdrup, 1992). Fine earth (soil particles smaller than 2 mm diameter) mineralogy (Mareschal, 2008) was implemented in PROFILE and the mineral surface area was cal-

ibrated so as to reproduce Na concentrations in the soil solution (Online resource 2).

2.3.3.1. Net uptake. In 2001, biomass samples and tree measurements were collected from 14 beech trees. Allometric equations predicting total biomass and mineral mass were established. Forest inventories were carried out yearly from 2002 to 2008 and the allometric equations were applied to these inventories. Net uptake was computed from the difference of immobilised nutrients between two consecutive years.

2.3.3.2. Drainage losses. The leaching flux at 60 cm depth was estimated by multiplying measured tension-cup lysimetre concentrations with the modelled water drainage flux. The water drainage flux was modelled with BILJOU (Granier et al., 1999), a pool and flux model. The model was calibrated over 2002–2008 using daily soil water content data collected with TDR probes (van der Heijden et al., 2013).

2.4. Statistical analysis

Temporal trends in atmospheric deposition and soil solution concentration were tested with the Mann–Kendall test (Mann, 1945; Hoeffding, 1948; Kendall, 1975).

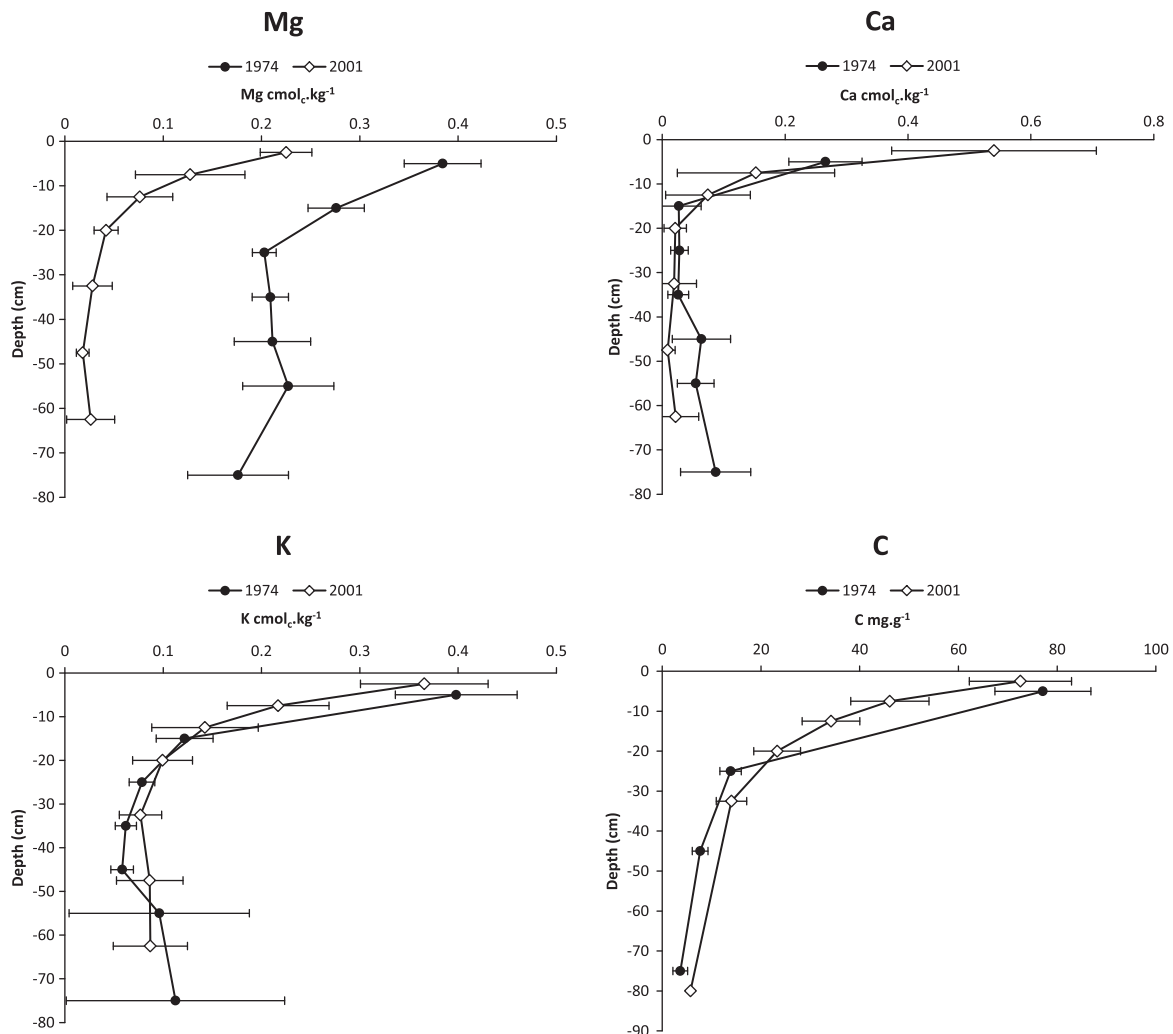


Fig. 3. Comparison of soil exchangeable base cations (Mg, Ca and K) and soil carbon content between 1974 and 2001. Exchangeable base cations are expressed in $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$ and carbon content in $\text{mg}_c \text{g}^{-1}$. Error bars are standard deviations calculated for the soil sample replicates (spatial variability).

Differences in soil exchangeable base cations and carbon pools in 1974 and 2001 could not be statistically tested as sampled depths differed between both dates. Pool size differences were characterised as significant if they were superior to the sum of spatial variability (standard deviation) in 1974 and 2001.

3. Results

3.1. Soil nutrient pool change over 1974–2001

Soil exchangeable base cation (Mg, Ca and K) and soil carbon pool change was estimated over the 1974–2001 by comparing soil samples from the two sampling dates (Fig. 3). Exchangeable magnesium strongly decreased between 1974 and 2001 in the whole soil profile (0–70 cm). However, no significant change could be observed for exchangeable Ca and K: differences between dates were smaller than spatial variability at both sampling dates. No significant change in soil C was observed. Between 1974 and 2001, the Mg pool decreased by 145 kg ha^{-1} , that is a $5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ mean annual decrease. Changes in Ca and K pools were quite small as reported above: soil exchangeable Ca and K decreased by respectively 27 kg ha^{-1} ($1 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) and 21 kg ha^{-1} ($0.8 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$).

3.2. Atmospheric deposition and soil solution composition

No tendencies were observed in atmospheric deposition levels (S, Ca, Mg, K) at the Breuil-Chenué site over the 2003–2008 period (Fig. 4). At the RENECOFOR-DOU71 site, sulphate and calcium wet deposition levels strongly decreased over the 1993–2009 period: sulphate decreased from ca. $6 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ to ca. $4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ and Ca from ca. $6 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ to ca. $4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$. Mg wet deposition levels at the RENECOFOR-DOU71 site remained constant. S and Ca dry deposition levels also decreased over the period (data not shown).

Soil solution was monitored at the Breuil-Chenué site over the 2003–2008 period with tension-cup lysimeters, only the 15 and 60 cm depths are presented here (Fig. 5). At 15 cm depth, soil solution pH decreased slightly over the study period ($p = 0.019$ and $\tau = -0.179$). Sulphate concentrations strongly decreased at 15 cm depth over the study period ($p < 0.0001$ and $\tau = -0.582$). All base cation concentrations (Mg, Ca and K) also decreased throughout the study period (Mg: $p < 0.0001$ and $\tau = -0.643$; Ca: $p < 0.0001$ and $\tau = -0.430$; K: $p < 0.0001$ and $\tau = -0.301$). Nitrate concentrations were not as high as sulphate or chloride. Although chloride and sulphate had similar concentrations at the end of the study period, the major anion remained sulphate. All base cation concentrations (Mg, Ca and K) also decreased throughout the study period (Fig. 5).

At 60 cm depth, soil solution pH remained stable throughout the study period. Sulphate concentrations also decreased at 60 cm depth ($p < 0.001$ and $\tau = -0.328$) but at a much slower rate and sulphate concentration levels were much higher than at 15 cm depth. Nitrate concentrations were negligible; Mg and Ca concentrations decreased slightly over the period (Mg: $p < 0.0001$ and $\tau = -0.443$; Ca: $p < 0.0001$ and $\tau = -0.448$) while potassium and aluminium concentrations remained constant throughout the period.

3.3. Nutrient fluxes and input–output budgets

Mean annual nutrient fluxes and input–output nutrient budgets were computed over the 2003–2008 period (Table 4). Base cation inputs (atmospheric deposition and mineral weathering) were very low. N deposition was high compared to S deposition and NH_4^+ accounted for 62% of total N deposition.

Foliar absorption estimates were high for N. A flux of Ca possibly absorbed (or retained) by the foliage was also estimated ($0.8 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) but was not constant every year: some years a

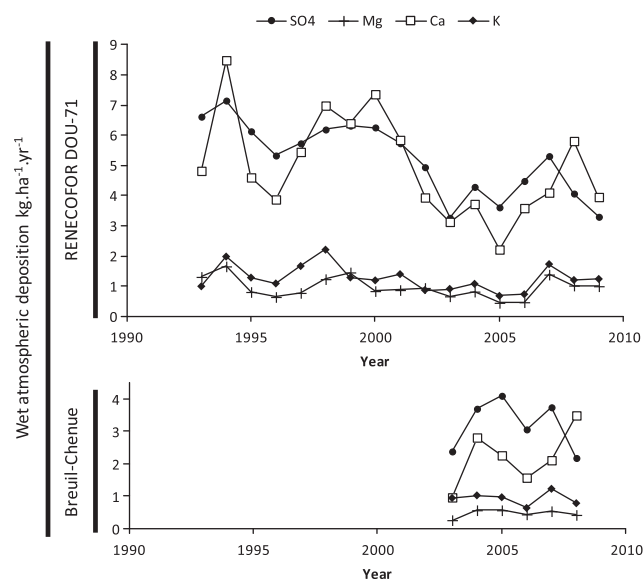


Fig. 4. Wet atmospheric deposition of SO_4 , Mg, Ca and K at the RENECOFOR-DOU71 monitoring site over the 1993–2009 period and at the Breuil-Chenué site over the 2003–2008 period. Fluxes are expressed in $\text{kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$.

net foliar leaching flux was computed ($0.1 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$). K was strongly leached from the canopy ($13.9 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$). Litterfall fluxes exceeded total inputs (deposition and weathering) for all elements (N, P, Mg, Ca and K). Nutrient leaching in the soil decreased with depth for N, P, Mg, Ca and K but increased from $6.1 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ at 15 cm depth to $9.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ at 60 cm depth for S. For all elements, the uptake was the greatest flux in the nutrient budget equation.

Nutrient budgets were negative for all elements (Table 4). Budgets were strongly negative for Ca, K, N and S ($-3.1 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$, $-7.1 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$, $-4.2 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ and $-4.9 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ respectively).

The relative importance of the different pools and fluxes between ecosystem pools in the turnover of soil exchangeable Mg and Ca pools was assessed (Fig. 6). Above-ground biomass was an important Mg and Ca pool and represented 76% and 243% of the soil exchangeable pools. The organic layer also represented an important nutrient pool (respectively 38% and 90% of the soil exchangeable pool of Mg and Ca). The turnover of soil exchangeable Mg and Ca pools was mainly driven by nutrient uptake and litterfall most especially for Ca ($17.2\% \text{ yr}^{-1}$).

3.4. Foliar nutrient concentration

Except Mg, all other nutrients (N, P, Ca and K) were above the deficiency level (Fig. 7). However, foliar P concentrations fell between the critical and the deficiency level. Foliar K concentrations were high in 2003 then strongly decreased until 2005 then remained constant in 2005, 2006 and 2007. Foliar N concentrations also decreased but remained close to optimal levels. No tendency was observed for foliar Ca concentrations which remained close to optimal levels. Foliar Mg concentrations were, on the other hand, well below the deficiency level throughout the study period.

4. Discussion

4.1. Evidence of past and ongoing soil Mg and Ca depletion

4.1.1. Past trends assessed from soil data comparison – 1974 to 2001

Because of different sampling protocols, the change in soil exchangeable Mg and Ca pools could not be statistically demon-

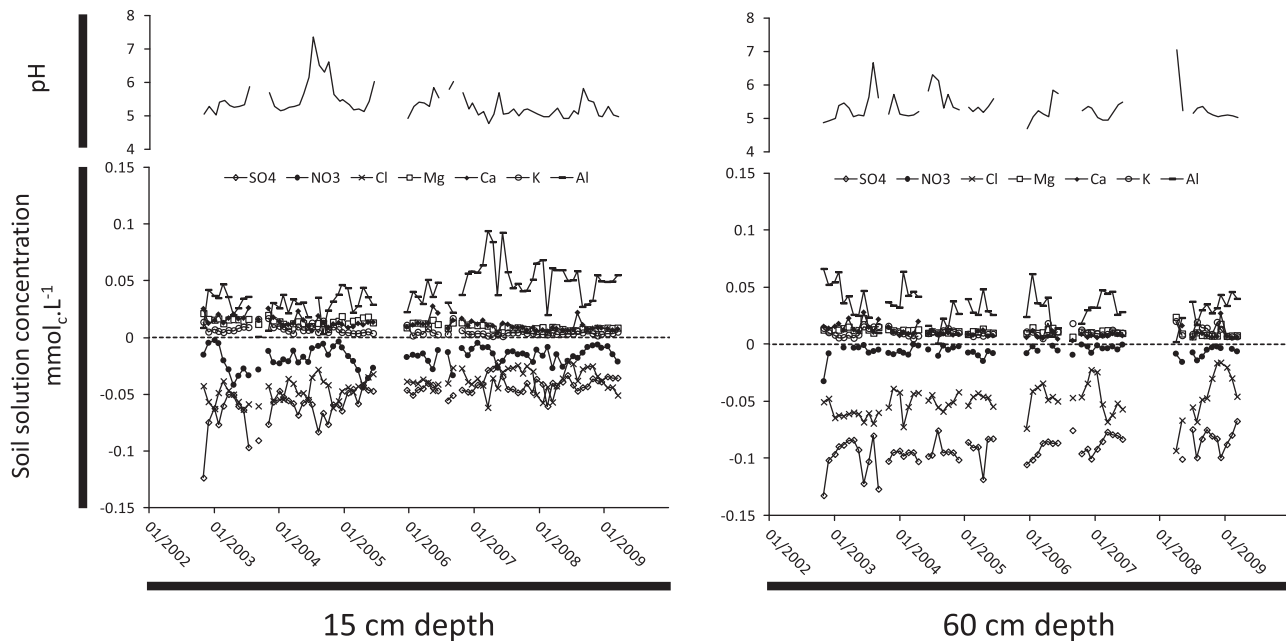


Fig. 5. Soil solution pH and concentration monitoring for major elements (SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Al^{3+}) in the beech plot of the Breuil-Chenu site over the 2003–2008 period at 15 and 60 cm depth. Concentrations are expressed in $\text{mmol}_c \text{L}^{-1}$, cations were given positive values and anions negative values.

Table 4

Mean nutrient fluxes and input–output budgets computed over the 2003–2008 period in the beech plot at the Breuil-Chenu site. Missing values either were not measured at the Breuil-Chenu site (S uptake) or were negligible (S and P weathering, and P atmospheric deposition and throughfall fluxes).

		Ca	Mg	K	N	P	S
Inputs	Wet deposition	2.2	0.5	0.9	7.9	–	3.2
	Dry deposition	1.5	0.3	0.7	4.4	–	1.3
	Atmospheric deposition	3.7	0.8	1.6	12.3	–	4.5
	Weathering	0.2	0.5	2.9	–	–	–
Cycling	Throughfall	2.5	0.6	11.2	6.3	–	3.4
	Stemflow	0.5	0.2	4.3	2.2	–	1.1
	Foliar absorption	0.8	0.0	0.0	3.8	–	0.0
	Foliar leaching	0.1	0.1	13.9	0.0	–	0.0
	Litterfall	10.4	1.6	8.9	44.6	1.9	–
Outputs	Leaching 15 cm	2.0	1.2	1.5	4.0	0.1	6.1
	Leaching 30 cm	1.2	1.1	1.4	2.2	0.1	9.5
	Leaching 60 cm	1.4	0.9	2.6	2.3	0.1	9.4
	Net uptake	5.6	1.2	8.9	14.3	1.5	–
Budget		–3.1	–0.8	–7.1	–4.2	–1.6	–4.9

strated. Nevertheless, the comparison of soil exchangeable pools in 1974 and 2001 gives insight on the trends in exchangeable base cation pool size change. A strong decrease in Mg pools was evidenced while Ca and K pools were relatively stable over time (Fig. 3). The soil samplings in 1974 and 2001 did not cover the same area. However it is unlikely that this biased results because (i) soils in 2001 were sampled in a plot inside the area sampled in 1974 (Fig. 1) and (ii) spatial variability of soil Ca and K pools (standard deviation of nutrient pools, $n = 16$) in 2001 (34 and 64 kg ha^{-1} respectively) was also very close to spatial variability ($n = 8$) in 1974 (28 and 56 kg ha^{-1}). It is unlikely that soil extraction methods or sample analysis methods may explain for such a difference. Soil bulk density was not measured in 1974. However, it is also unlikely that such a change in bulk density may explain the differences between both dates.

4.1.1.1. Change in soil Mg pools. The immobilization of Mg in above-ground biomass and in the humus layer during the 1974–2001 period (ca. $1.3 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) was much lower than the computed

depletion (ca. $5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$). This shows that the main cause for Mg depletion was probably the leaching flux (ca. $3.7 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$). However, the measured Mg leaching flux over 2003–2008 was $0.9 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$. The higher Mg leaching flux over the 1974–2001 period may be explained by:

- i. A higher SO_4 leaching flux due to higher SO_4 deposition levels (Fig. 4).
- ii. By preferential Mg leaching due to rapid mineralization of the humus after the clear cut in 1975.

Although, it is probable that the SO_4 leaching flux was higher over the 1974–2001, given trends in atmospheric deposition and soil solution composition change, it seems likely that most of Mg leaching occurred in the years after the clear cut in 1975. Indeed, there is evidence that the cation composition of leaching fluxes after ecosystem disturbances is similar to the composition of soil cation exchangeable pools (Legout et al., 2009b). Mg would have been preferentially leached compared to Ca and K because Mg

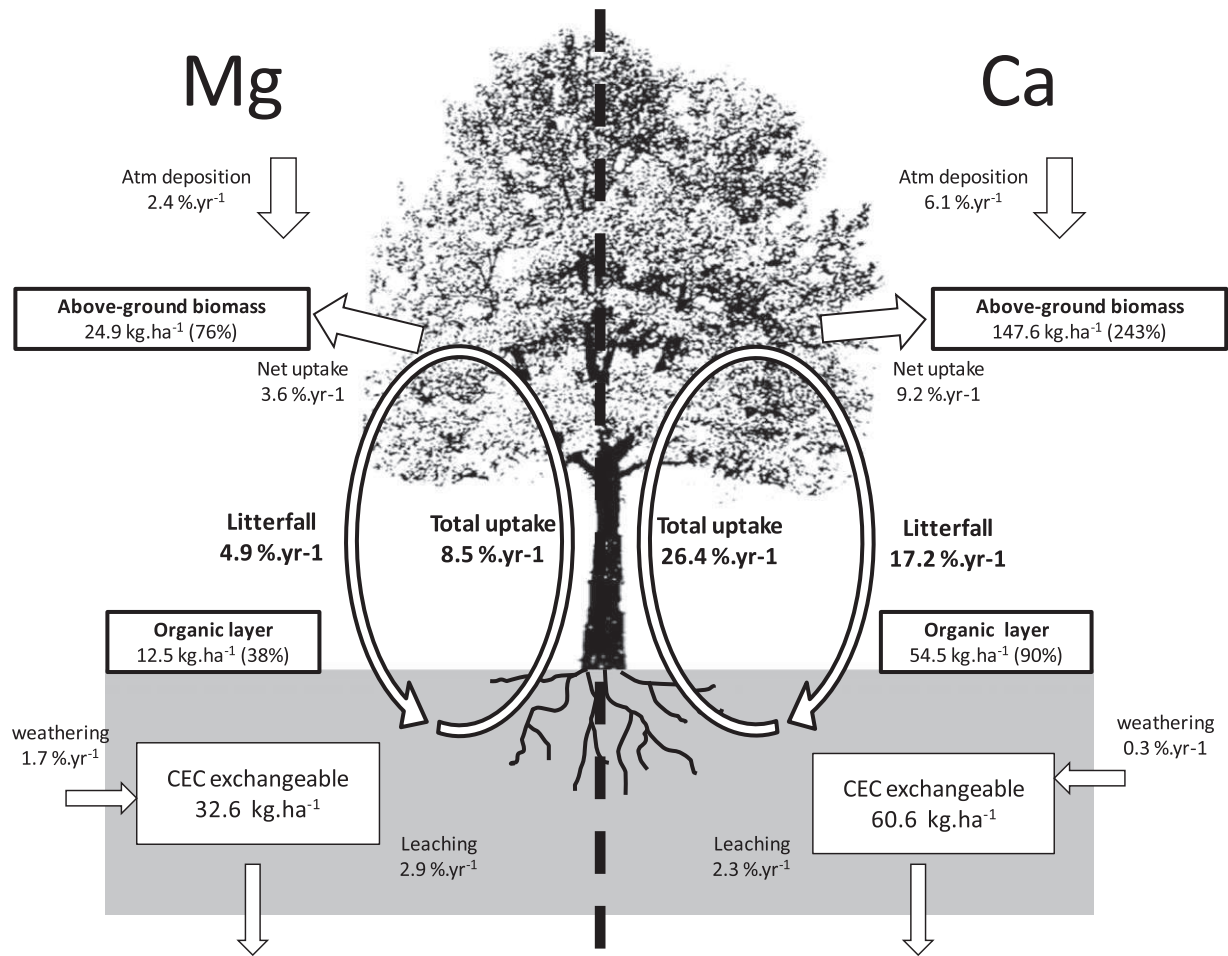


Fig. 6. Mg and Ca mean annual fluxes between ecosystem pools. Fluxes were expressed relatively to the soil CEC exchangeable pool (Flux/soil CEC pool size) to assess exchangeable Mg and Ca pool turnover. Above-ground biomass and organic layer pool sizes are expressed in kg ha⁻¹ and in relative size (pool size/soil CEC pool size).

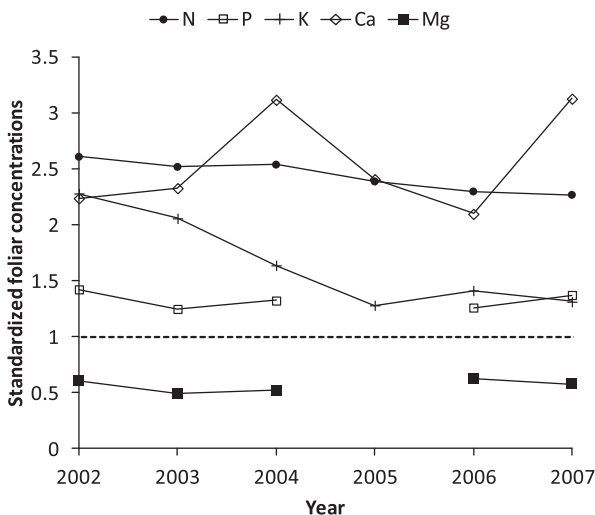


Fig. 7. Foliar concentrations (N, P, K, Ca and Mg) monitored over the 2002–2007 period. Concentrations were standardised by the deficiency level defined by Bonneau (1995). The dotted line represents the deficiency level for each element.

was more available on the soil CEC (Fig. 3): Mg represented 53% of all base cations (Mg + Ca + K) on the soil CEC in 1974. The preferential Mg leaching compared to Ca has been reported by many studies.

After the 1999 Lothar storm, Bonneau et al. (2006) evidenced for example Mg losses (100 kg ha⁻¹) while Ca pools increased (22 kg ha⁻¹). Some studies have reported no base cation losses after a clear cut but have however evidenced a change in the distribution of base cation pools in the soil profile (Johnson et al., 1997).

4.1.1.2. Change in soil Ca pools. Comparing mean pools, soil exchangeable Ca pools decreased on average by 1 kg ha⁻¹ yr⁻¹ during the 1974–2001 period. However differences between 1974 and 2001 were smaller than spatial variability at both sampling dates. A change in Ca deposition may partly explain the stability of soil Ca pools. This hypothesis was supported by the decrease in Ca deposition at the RENECOFOR-DOU71 site (Fig. 4). Over 1974–2001, we measured the total Ca immobilization in above ground biomass and organic layer (Table 3) and we estimated Ca weathering and leaching from the 2003–2008 period (Table 4). We then computed that a mean annual Ca deposition flux over 1974–2001 of ca. 8.7 kg Ca ha⁻¹ yr⁻¹ would compensate for the losses. Such Ca deposition rates although high are plausible (Fig. 4). This would imply that Ca deposition has continuously decreased since the 1970s in parallel to sulphur. This has been reported by many studies (Matzner and Meiwes, 1994; Hedin and Likens, 1996; Likens et al., 1996; Vuorenmaa, 2004; Meesenburg et al., 2009; van der Heijden et al., 2011).

4.1.2. Actual trends assessed with nutrient budgets – 2003 to 2008

Sulphate concentrations increased with depth (Fig. 5) as did the sulphate leaching flux (Table 4) which suggests a sulphate desorp-

tion flux. This was in agreement with the negative S input–output budgets (Table 4). Data from the RENECOFOR-DOU71 site show that sulphur deposition decreased in the 1990s (Fig. 4). It is likely that sulphate has not yet reached a new steady state between inputs and outputs. Sulphate desorption from soil has been reported by many studies (Courchesne et al., 2005; van der Heijden et al., 2011). The mean annual Mg and Ca input–output budgets were negative over 2003–2008 thus suggesting that Mg and Ca are currently being depleted from the soil profile. The Mg and Ca depletion rates over 2003–2008 was however respectively lesser and higher than the depletion rates over 1974–2001. The change in soil solution composition over 2003–2008 was in agreement with nutrient budgets. The decreasing concentrations of sulphate were combined with decreasing base cation concentrations (Mg, Ca and K) at both 15 and 60 cm depth. Mg, Ca and K were correlated to sulphate concentrations at 15 cm ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.337$, $R^2 = 0.336$ and $R^2 = 0.350$ respectively). At 60 cm depth, Mg and Ca were correlated to sulphate concentrations ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.332$ and $R^2 = 0.319$). However, at elevated concentrations (0.01 and $0.005 \text{ mmol}_c \text{ L}^{-1}$ at 15 and 60 cm depth respectively) NO_3 may also cause base cation leaching. Mg was significantly correlated to NO_3 for NO_3 concentrations above $0.01 \text{ mmol}_c \text{ L}^{-1}$ (Fig. 5) ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.356$). At 60 cm depth, Ca was also significantly correlated to NO_3 for NO_3 concentrations above $0.005 \text{ mmol}_c \text{ L}^{-1}$ ($p = 0.007$; $R^2 = 0.255$). However, NO_3 concentrations mainly remained below those thresholds. The main anion governing base cation leaching was SO_4 .

4.1.3. Potential causes to soil Mg and Ca depletion

As discussed above and like many other studies, sulphate deposition has strongly impacted Mg and Ca pools in this ecosystem for several decades. The decrease of Ca atmospheric deposition rates also was an important factor explaining suggested actual Ca depletion. However, the main factor explaining Mg and Ca depletion at our site was most probably the clear cut and swathing practices (exportation of nutrients in brash and organic layer and base cation losses due to leaching). Unfortunately the nutrient pools in the exported organic layer and brash were not measured in 1975. These pools may however be estimated from measured Mg and Ca pools in the organic layer in the native forest plot in 2001 (respectively 37 kg ha^{-1} and 74 kg ha^{-1}). Exported brash also probably represented a high Mg pool: in a 145 year old beech stand on a base poor soil, immobilised Mg in the branches was $\sim 60 \text{ kg ha}^{-1}$ (Legout, 2008). Mg losses from the ecosystem measured over the 1974–2001 ($\sim 107 \text{ kg ha}^{-1}$) may thus have been mitigated if brash and organic layer had not been exported/removed in 1975.

Nowadays, with increased demand for biomass harvest (Ericsson, 2004; Puech, 2009), the impact of silvicultural practices on soil chemical fertility is probably the main factor to consider when studying soil chemical fertility. Monitoring networks were set up to assess the impact of acid rain on forest ecosystems. In their current form they are thus not adapted to monitor the impact of silvicultural practices on soil nutrient pools.

4.2. Limits to conventional approaches to soil nutrient depletion

In the present study we investigated nutrient pool size change through commonly used approaches: soil data comparison and input–output nutrient budgets. Our data highlight the limits of these different approaches.

4.2.1. Soil nutrient pool size change measured by soil samplings

Comparing soil data from two different sampling dates is the only direct method to measure nutrient pool size change. However, studying change in exchangeable base cation pool is often limited by the difficulty to demonstrate statistically significant changes in

soil exchangeable pools due to the need of similar sampling and extraction protocols and high spatial variability of exchangeable pools. This is all the more difficult when exchangeable pools are very low and changes are small. For instance, a decrease of soil Ca pools was observed in this study between 1974 and 2001 but was smaller than spatial variability at both sampling dates. Some studies have also shown significant intra-annual soil nutrient pool variability (Johnson et al., 1990; Collignon et al., 2011) which complicates comparisons.

Although soil data comparison may evidence soil nutrient pool change over time, soil samplings are insufficient to investigate the different possible causes to nutrient pool change.

4.2.2. Input–output nutrient budgets

Nutrient budgets enable to study soil nutrient pool size change and the causes for nutrient depletion or accumulation. In order to accurately assess nutrient pool size change, input and output fluxes must be accurately measured. This is currently a major issue in nutrient budget calculation because: (i) the hypotheses on which the calculation methodology of certain fluxes (atmospheric deposition and weathering) may be inaccurate, (ii) estimating nutrient budget uncertainty is virtually impossible and (iii) validating input–output budgets is often difficult.

4.2.2.1. Nutrient budget hypotheses. Atmospheric deposition: Estimating atmospheric dry deposition has always been tricky because canopy budget models are based on many assumptions (Ulrich, 1983; Staelens et al., 2008) which are difficult to verify. Thus potential errors in total atmospheric deposition may drastically change nutrient budget results. For instance, the use of Na as a tracer ion to estimate base cation dry deposition has been criticised (Reiners and Olson, 1984). Na may be adapted to estimate dry deposition of oceanic origin (Mg for example) but the origin of Ca deposition is mainly continental. Using Na as a tracer ion may thus underestimate Ca dry deposition. Aeolian dust deposition, which is currently not taken into account in nutrient budgets, may also be a base-cation input to forest ecosystems (Lequy et al., 2012). This is paired to potential Mg and Ca foliar absorption fluxes which are commonly neglected in the canopy budget model.

Mineral weathering: The PROFILE model has been widely used to estimate mineral weathering fluxes in forest ecosystems. The estimated weathering fluxes in the beech plot were low and may be underestimated. Calibrating mineral surfaces with Na probably minimises the Mg-bearing mineral surface area (phyllites). Furthermore, weathering processes have been shown to be more important in the rhizosphere (Turpault et al., 2009) and numerous studies have shown that selective and biologically-mediated (mycorrhizal fungi) weathering of Mg-rich minerals (biotite for example) is an important process for Mg tree-nutrition (Calvaruso et al., 2006; Arocena et al., 2011). However, no data is available to model or estimate the impact of these processes on the total weathering flux. The Ca-bearing mineral surface area is likely to be correct: Ca is mainly found in Na-bearing minerals such as feldspar. Nevertheless, the contribution of apatite to Ca rates may be underestimated. On the whole estimated weathering rates are likely to be correct: weathering rates of Mg and Ca were close to previously reported rates for base poor soils (Fichter et al., 1998; Ranger et al., 2002; van der Heijden et al., 2011), total Mg and Ca pools in the soil (Table 3) and bedrock (Table 1) were very low and mineral weathering did not buffer in our case the decrease in Mg and Ca concentrations in soil solution as also observed by Alewell et al. (2000).

Nutrient Leaching: The estimated water drainage flux is probably correct. Indeed, the water drainage flux was estimated with a hydrological model BILJOU adapted to forest ecosystems, calibrated with a soil humidity data base (7 years) and a water tracing experiment (van der Heijden et al., 2013). Many studies have ar-

gued that zero-tension lysimeters are best adapted to estimate nutrient leaching fluxes (Ranger et al., 1993; Marques et al., 1996). However, tension-cup lysimeters collect both slow convective and gravitational water. A significant amount of nutrient leaching may occur in slow convective water (Legout et al., 2009a; van der Heijden et al., 2013) which may not be collected with zero-tension lysimeters.

Net uptake: Allometric equations have been widely used to estimate nutrient pools in above-ground biomass (Alban et al., 1978; Saint-André et al., 2005; Sicard et al., 2006). Potential errors when estimating nutrient net uptake (difference between nutrient pools in above-ground biomass at two different dates) may be induced by using the same set of allometric equations established at a given stand age over a period of time. For instance, Genet et al. (2011) showed that parameters to biomass allometric equations vary with stand age. This age effect was related to changes in both stem form and wood density for the trunk and to changes in hydraulic conductance for the crown.

4.2.2.2. Nutrient budget uncertainty. Quantifying the uncertainty is essential to interpret results from ecosystem studies in general and nutrient budgets in particular (Oenema et al., 2003; Lehrter and Cebrian, 2010). Quantifying the uncertainty of certain pools or fluxes is relatively straightforward. For instance, nutrient pools in above-ground biomass have been assessed with error propagation models (Sicard et al., 2006; Yanai et al., 2010) and was below 15%. However, quantifying nutrient budget uncertainty is challenging because nutrient budgets are the result of numerous measurements (Fig. 2) and uncertainty of some measurements and modeled fluxes (water drainage flux, PROFILE weathering flux) are difficult to estimate. There is clearly a need to develop new methods to estimate nutrient flux uncertainty.

4.2.2.3. Nutrient budget validation. In order to validate the hypotheses behind nutrient budgets and nutrient budget prediction, the latter should be compared to measured soil nutrient pool change. Many discrepancies between nutrient budget predictions and soil chemical data have been reported. For instance, in the Vosges Mountains (France), no Mg and Ca depletion from the soil was observed over a 13 year period while nutrient budgets suggested Mg ($0.8 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) and Ca ($1.9 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) depletion. Hazlett et al. (2011) observed a similar discrepancy over a 17–19 year period in the Turkey Lakes catchment (Canada). Similarly, nutrient budgets computed by Johnson et al. (1982) in a oak stand to study the impact of whole-tree harvesting on soil nutrient pools. These budgets were not validated by sampling the soil 15 years after the clear-cut (Johnson and Todd, 1998). The beech-plot soil at the Breuil-Chenue site was not resampled at the end of the study period. Indeed, predicted depletion of Mg and Ca over 2001–2008 (7 and 28 kg ha^{-1} respectively) was lower than spatial variability of soil exchangeable pools in 2001 (8 and 28 kg ha^{-1}). Soil data comparison would have been inconclusive as discussed above.

4.3. How the ecosystem may cope with such low levels of nutrients?

4.3.1. Discrepancies in the plant-soil relation

Nutrient budgets suggest that Mg and Ca soil exchangeable pools are currently decreasing at a high rate (2.4 yr^{-1} and 5 yr^{-1} respectively). However, there was no sign of forest decline (loss of biomass productivity, yellowing of leaves...). Indeed, according to tree growth indicators, the productivity of the beech stand (determined by tree height at a given age) was in the highest class according to beech yield classes for the north-east of France (Décourt, 1973) but also compared to a range of beech stands in the north-east of France (Bontemps et al., 2010). However, foliar Mg concentrations were below the deficiency level throughout

the period according to (Bonneau, 1995) and foliar P and K concentrations were close to deficiency (Fig. 7).

Data is insufficient to draw conclusions on the discrepancy between tree growth and foliar concentrations and soil exchangeable pools. For instance, it may be due to a delayed response of tree growth to changing nutrient availability. Indeed, no foliar concentration data prior to 2002 was available. Our results are nonetheless further evidence that the relation between plant growth and soil chemical fertility, and plant response to nutrient deficiencies are yet unclear (Jandl et al., 2004; Jonard et al., 2009; Miller and Watmough, 2009).

Foliar Ca concentration is also an unsolved issue. Indeed, foliar Ca concentration was close to optimal levels. Although the foliar Ca concentration level is difficult to interpret, the differences between foliar Mg and Ca concentration levels (one below deficiency, one close to optimal) while both Mg and Ca exchangeable pools are very low was very surprising. Van der Heijden et al. (2011) also found a similar discrepancy in a silver fir plot. Low foliar Mg concentrations may be caused by Al toxicity. Indeed, de Wit et al. (2010) artificially increasing Al concentrations in a spruce forest and found similar results: foliar Mg concentrations decreased with increased soil solution Al concentrations but foliar Ca concentrations remained stable. Many studies have suggested that trees may also access nutrient sources such as uptake from deep soil layers or organically bound base cations that are currently poorly known (Johnson and Todd, 1998; Dijkstra and Smits, 2002; Bailey et al., 2003; Jandl et al., 2004; Grigal and Ohmann, 2005). Our understanding of the biological cycling of nutrients is incomplete but the latter probably plays a major role in forest ecosystems on base-poor soils.

4.3.2. Evidence of rapid and conservative base cation nutrient cycling

Exchangeable Ca and Mg pools in the soil were very low (Table 3). Ca and Mg pools at the Breuil-Chenue site were compared to other monitored sites in France and were ones of the lowest for all three nutrients (Nys et al., 1983; Nys, 1987; Nys and Ranger, 1988; Legout, 2008; Legout et al., 2008). In addition, the base cation pool in the forest floor and above-ground biomass was greater than the exchangeable pool in the soil profile. Uptake and litterfall were the most important fluxes in the turnover of soil exchangeable Mg and Ca pools (Fig. 6). Finally, the exchangeable Ca and Mg pools were highest in the topsoil. This suggests that the biological cycling of Mg and Ca in the organic and topsoil layer is a key process in the nutrient cycling of Mg and Ca on this base-poor soil.

In the nutrient budget model, the importance of the total uptake and litterfall fluxes also highlights the rapidity of nutrient cycling: soil exchangeable Mg and Ca were cycled at a rate of 4.9 yr^{-1} and 17.2 yr^{-1} respectively (Fig. 6). As discussed above, it is likely that the above-ground biomass Ca pool was built from past atmospheric deposition. This implies a very high efficiency to incorporate Ca inputs to a very conservative cycle. The organic layer and the above-ground biomass represented a very large proportion of Mg and Ca pools in the ecosystem. However, variations of these pools are very rarely quantified but may represent a significant nutrient source in the ecosystem. For instance, nutrients may be remobilised in wood tissues (Penninckx et al., 2001). Mg internal cycling has been reported by many studies (Oren et al., 1988; Proe et al., 2000; Weatherall et al., 2006). Ca internal cycling studies are rarer. Nevertheless, Ca stored in plant tissues as Ca oxalate may be remobilised (Nakata, 2003). Nutrient pool size may be less important to soil chemical fertility than the amount of nutrient that is recycled annually by biological cycling.

5. Conclusion

Although soil exchangeable Mg and Ca pools were very low, depletion was evidenced in a 35 year-old beech plot in the Morvan

Mountains over the 1974–2008 period. Most of Mg depletion occurred over 1974–2001 ($\sim 5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$), while soil exchangeable Ca pools remained stable over 1974–2001 but Ca budgets suggested depletion over 2003–2008 ($3.1 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$). This broad-leaved forest showed no sign of recovery from acidification although S deposition levels decreased in the Morvan Mountains since the 1990s. Recent losses of Mg and Ca were explained by the desorption of sulphate from the soil over the 2003–2008 period. Nevertheless the silvicultural practices (clear cut and swathing) were probably the main factor explaining current Mg and Ca pools. Mg and Ca depletion over 1974–2008 would have been mitigated if swathing practices had not been carried out before plantation. Soil exchangeable Mg and Ca pools would not be as low and preoccupying for the sustainability of the ecosystem.

Our results show the limits of conventional approaches to measure nutrient pool size change over time. These limits are due to (1) methods (difficulty to demonstrate nutrient pool size change due to high spatial variability, measuring atmospheric deposition, mineral weathering fluxes) and (2) our current knowledge of nutrient cycling. In nutrient poor ecosystems, each input, output and internal flux is equally important to plant nutrition and the sustainability of soil chemical fertility. It is necessary to investigate new methods to estimate these fluxes for instance by using unconventional isotopic approaches using natural variations of Mg and Ca isotope ratios (e.g. Holmden and Bélanger, 2010; Bolou-Bi et al., 2012) or isotopic labeling, tracing (van der Heijden et al., in press) and dilution techniques.

Acknowledgements

We would like to thank the following institutions: Région Lorraine and the European Fund for Regional Development (FEDER), GIPECOFOR (ore and Soere F-ORE-T) and the Zone Atelier Moselle (ZAM) for funding the present study. We would also like to thank l'Office National des Forêts, Dominique Gelhaye, Pascal Bonnaud and Gilles Nourisson for their contribution to the Breuil-Chenu site management, sampling and analysis over the years.

We are also grateful to the RENECOFOR network for making the DOU-71 RENECOFOR monitoring site data available.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2012.12.045>.

References

- Akelsson, C., Westling, H., Sverdrup, H., Gundersen, P., 2007. Nutrient and carbon budgets in forest soils as decision support in sustainable forest management. *Forest Ecol. Manage.* 238, 167–174.
- Akselsson, C., Sverdrup, H.U., Holmqvist, J., 2005. Estimating weathering rates of Swedish forest soils in different scales, using the PROFILE model and affiliated databases. *J. Sustain. For.* 21, 119–131.
- Alban, D.H., Perala, D.A., Schlaegel, B.E., 1978. Biomass and nutrient distribution in aspen, pine, and spruce stands on the same soil type in Minnesota. *Can. J. For. Res.* 8, 290–299.
- Alewell, C., Manderscheid, B., Gerstberger, P., Matzner, E., 2000. Effects of reduced atmospheric deposition on soil solution chemistry and elemental contents of spruce needles in NE-Bavaria, Germany. *J. Plant Nutr. Soil Sci.-Z Pflanzenernahr. Bodenkd.* 163, 509–516.
- Arocena, J.M., Velde, B., Robertson, S.J., 2011. Weathering of biotite in the presence of arbuscular mycorrhizae in selected agricultural crops. *Appl. Clay Sci.* 1, 2.
- Augusto, L., Ranger, J., Binkley, D., Rothe, A., 2002. Impact of several common tree species of European temperate forests on soil fertility. *Ann. For. Sci.* 59, 233–253.
- Bailey, S.W., Buso, D.C., Likens, G.E., 2003. Implications of sodium mass balance for interpreting the calcium cycle of a forested ecosystem. *Ecology* 84, 471–484.
- Barrett, K., Hjelbrekke, A.G., Tarrason, L., Schaug, J., 2000. An evaluation of trends for concentrations in air and precipitation. In: Tarrason, L., Schaug, J. (Eds.), *Transboundary acidification and eutrophication in Europe*, EMEP Summary Report 2000. Norwegian Meteorological Institute, Oslo, Norway, pp. 41–48.
- Berger, T.V., Untersteiner, H., Topfiter, M., Neubauer, C., 2009. Nutrient fluxes in pure and mixed stands of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*). *Plant Soil* 322, 317–342.
- Berthrong, S.T., Jobbagy, E.G., Jackson, R.B., 2009. A global meta-analysis of soil exchangeable cations, pH, carbon, and nitrogen with afforestation. *Ecol. Appl.* 19, 2228–2241.
- Bolou-Bi, E.B., Vigier, N., Poszwa, A., Boudot, J.P., Dambrine, E., 2012. Effects of biogeochemical processes on magnesium isotope variations in a forested catchment in the Vosges Mountains (France). *Geochim. Cosmochim.* 87, 341–355.
- Bonneau, M., 1995. Fertilisation des forêts dans les pays tempérés. ENGREF, Nancy.
- Bonneau, M., bonnaud, P., Gelhaye, D., Ranger, J., 2006. Observatoire de la qualité des sols (O.Q.S.) du Donon: contenu et flux de Ca, Mg et K après la tempête de 1999. In: *Etude et gestion des sols (L')*.
- Bontemps, J.-D., Hervé, J.-C., Dhôte, J.-F., 2010. Dominant radial and height growth reveal comparable historical variations for common beech in north-eastern France. *For. Ecol. Manage.* 259, 1455–1463.
- Bormann, F.H., Likens, G.E., 1967. Nutrient cycling. *Science* 155, 424–429.
- Boucher, O., Pham, M., 2002. History of sulfate aerosol radiative forcings. *Geophys. Res. Lett.*, 29.
- Boxman, A.W., Peters, R.C.J.H., Roelofs, J.G.M., 2008. Long term changes in atmospheric N and S throughfall deposition and effects on soil solution chemistry in a Scots pine forest in the Netherlands. *Environ. Pollut.* 156, 1252–1259.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Frey-Klett, P., 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1258–1266.
- Collignon, C., Calvaruso, C., Turpault, M.P., 2011. Temporal dynamics of exchangeable K, Ca and Mg in acidic bulk soil and rhizosphere under Norway spruce (*Picea abies* Karst.) and beech (*Fagus sylvatica* L.) stands. *Plant Soil* 349, 355–366.
- Cooper, D.M., 2005. Evidence of sulphur and nitrogen deposition signals at the United Kingdom Acid Waters Monitoring Network sites. *Environ. Pollut.* 137, 41–54.
- Courchesne, F., Cote, B., Fyles, J.W., Hendershot, W.H., Biron, P.M., Roy, A.G., Turmel, M.C., 2005. Recent changes in soil chemistry in a forested ecosystem of Southern Quebec, Canada. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 1298–1313.
- Cronan, C.S., Grigal, D.F., 1995. Use of calcium/aluminium ratios as indicators of stress in forest ecosystems. *J. Environ. Qual.* 24, 209–226.
- De Schrijver, A., Geudens, G., Augusto, L., Staelens, J., Mertens, J., Wuyts, K., Gielis, L., Verheyen, K., 2007. The effect of forest type on throughfall deposition and seepage flux: a review. *Oecologia* 153, 663–674.
- de Wit, H.A., Eldhuset, T.D., Mulder, J., 2010. Dissolved Al reduces Mg uptake in Norway spruce forest: results from a long-term field manipulation experiment in Norway. *For. Ecol. Manage.* 259, 2072–2082.
- Décourt, N., 1973. Tables de production pour les forêts françaises. Nancy.
- Dejou, J., Guyot, J., Robert, M., Pedro, G., 1977. Evolution superficielle des roches cristallines et cristallophylliennes dans les régions tempérées. INRA, Paris.
- Dijkstra, F.A., Smits, M.M., 2002. Tree species effects on calcium cycling: the role of calcium uptake in deep soils. *Ecosystems* 5, 385–398.
- Duchauffour, P., Bonneau, M., 1959. Une nouvelle méthode de dosage du phosphore assimilable dans les sols forestiers. *Bull. AFES* 4, 193–198.
- Ericsson, K., 2004. Bioenergy policy and market development in Finland and Sweden. *Energy Policy* 32, 1707–1721.
- Falkengren-Grerup, U., Tyler, G., 1991. Changes of cation pools of the topsoil in south Swedish beech forests between 1979 and 1989. *Scand. J. For. Res.* 6, 145–152.
- Fichter, J., Dambrine, E., Turpault, M.P., Ranger, J., 1998. Base cation supply in spruce and beech ecosystems of the Strengbach catchment (Vosges Mountains, N-E France). *Water Air Soil Pollut.* 104, 125–148.
- Fowler, D., Cape, J.N., Unsworth, M.H., 1989. Deposition of atmospheric pollutants on forests. *Philos. Trans. the Roy. Soc. Lond. B – Biol. Sci.* 324, 247–265.
- Genet, A., Wernsdörfer, H., Jonard, M., Pretzsch, H., Rauch, M., Ponette, Q., Nys, C., Legout, A., Ranger, J., Vallet, P., Saint-André, L., 2011. Ontogeny partly explains the apparent heterogeneity of published biomass equations for *Fagus sylvatica* in central Europe. *For. Ecol. Manage.* 261, 1188–1202.
- Granier, A., Bréda, N., Biron, P., Villette, S., 1999. A lumped water balance model to evaluate duration and intensity of drought constraints in forest stands. *Ecol. Model.* 116, 269–283.
- Grigal, D.F., Ohmann, P.R., 2005. Calcium and forest systems: diffusion from deep sources. *Soil Sci.* 170, 129–136.
- Hazlett, P.W., Curry, J.M., Weldon, T.P., 2011. Assessing decadal change in mineral soil cation chemistry at the Turkey Lakes watershed. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 287–305.
- Hedin, L.O., Likens, G.E., 1996. Atmospheric dust and acid rain. *Sci. Am.* 275, 88–92.
- Hoefding, W., 1948. A class of statistics with asymptotically normal distribution. *Ann. Math. Stat.* 19, 293–325.
- Holmden, C., Bélanger, N., 2010. Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochim. Cosmochim.* 74, 995–1015.
- Jandl, R., Alewell, C., Prietzel, J., 2004. Calcium loss in Central European forest soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68, 588–595.
- Johnson, C.E., Romanowicz, R.B., Siccama, T.G., 1997. Conservation of exchangeable cations after clear-cutting of a northern hardwood forest. *Can. J. For. Res. – Rev. Can. Rech. For.* 27, 859–868.

- Johnson, D.W., Cresser, M.S., Nilsson, S.L., Turner, J., Ulrich, B., Binkley, D., Cole, D.W., 1990. Soil changes in forest ecosystems – evidence for and probable causes. *Proc. Roy. Soc. Edinb. B – Biol. Sci.* 97, 81–116.
- Johnson, D.W., Todd, D.E., 1998. Harvesting effects on long-term changes in nutrient pools of mixed oak forest. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 1725–1735.
- Johnson, D.W., West, D.C., Todd, D.E., Mann, L.K., 1982. Effects of sawlog versus whole-tree harvesting on the nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium budgets of an upland mixed oak forest. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 1304–1309.
- Jonard, M., André, F., Dambrine, E., Ponette, Q., Ulrich, E., 2009. Temporal trends in the foliar nutritional status of the French, Walloon and Luxembourg broad-leaved plots of forest monitoring. *Ann. For. Sci.* 66, 412–421.
- Kendall, M., 1975. Rank Correlation Methods. Charles Griffin, London.
- Kristensen, H.L., Gundersen, P., Callesen, I., Reinds, G.J., 2004. Throughfall nitrogen deposition has different impacts on soil solution nitrate concentration in European coniferous and deciduous forests. *Ecosystems* 7, 180–192.
- Laclau, J.P., Ranger, J., Deleporte, P., Nouvellon, Y., Saint-Andre, L., Marlet, S., Bouillet, J.P., 2005. Nutrient cycling in a clonal stand of Eucalyptus and an adjacent savanna ecosystem in Congo 3. Input-output budgets and consequences for the sustainability of the plantations. *For. Ecol. Manage.* 210, 375–391.
- Legout, A., 2008. Cycles Biogéochimiques et bilans de fertilité minérale en hêtres de plaine. Agroparistech-Engref, Nancy, 281.
- Legout, A., Legout, C., Nys, C., Dambrine, E., 2009a. Preferential flow and slow convective chloride transport through the soil of a forested landscape (Fougères, France). *Geoderma* 151, 179–190.
- Legout, A., Nys, C., Picard, J.F., Turpault, M.P., Dambrine, E., 2009b. Effects of storm Lothar (1999) on the chemical composition of soil solutions and on herbaceous cover, humus and soils (Fougères, France). *For. Ecol. Manage.* 257, 800–811.
- Legout, A., Walter, C., Nys, C., 2008. Spatial variability of nutrient stocks in the humus and soils of a forest massif (Fougères, France). *Ann. For. Sci.*, 65.
- Lehrter, J.C., Cebrian, J., 2010. Uncertainty propagation in an ecosystem nutrient budget. *Ecol. Appl.* 20, 508–524.
- Lequy, E., Conil, S., Turpault, M.P., 2012. Impacts of Aeolian dust deposition on European forest sustainability: a review. *For. Ecol. Manage.* 267, 240–252.
- Likens, G.E., Bormann, F.H., Pierce, R.S., Eaton, J.S., Johnson, N.M., 1977. Biogeochem. *For. Ecosyst.*
- Likens, G.E., Butler, T.J., Buso, D.C., 2001. Long- and short-term changes in sulfate deposition: effects of the 1990 clean air act amendments. *Biogeochemistry* 52, 1–11.
- Likens, G.E., Driscoll, C.T., Buso, D.C., 1996. Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. *Science* 272, 244–246.
- Likens, G.E., Driscoll, C.T., Buso, D.C., Siccamo, T.G., Johnson, C.E., Lovett, G.M., Fahey, T.J., Reiners, W.A., Ryan, D.F., Martin, C.W., Bailey, S.W., 1998. The biogeochemistry of calcium at Hubbard Brook. *Biogeochemistry* 41, 89–173.
- Mann, H., 1945. Non-parametric test against trend. *Econometrica* 13, 245–259.
- Mareschal, L., 2008. Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur minéralogie : bilan après 28 ans dans le site expérimental de Breuil (Morvan). Ressources Procédés Produits Environnement. Université Henri Poincaré, Nancy, 328.
- Mareschal, L., Bonnaud, P., Turpault, M.P., Ranger, J., 2010. Impact of common European tree species on the chemical and physicochemical properties of fine earth: an unusual pattern. *Eur. J. Soil Sci.* 61, 14–23.
- Marques, R., Ranger, J., Gelhaye, D., Pollier, B., Ponette, Q., Goedert, O., 1996. Comparison of chemical composition of soil solutions collected by zero-tension plate lysimeters with those from ceramic-cup lysimeters in a forest soil. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 407–417.
- Matzner, E., Meiwes, K.J., 1994. Long-term development of element fluxes with bulk precipitation and throughfall in two forested ecosystems of the German Solling area. *J. Environ. Qual.* 23, 162–166.
- McLaughlin, J.W., Calhoun, E.B.W., Gale, M.R., Jurgensen, M.F., Trettin, C.C., 2011. Biogeochemical cycling and chemical fluxes in a managed northern forested wetland, Michigan, USA. *For. Ecol. Manage.* 261, 649–661.
- McLaughlin, J.W., Phillips, S.A., 2006. Soil carbon, nitrogen, and base cation cycling 17 years after whole-tree harvesting in a low-elevation red spruce (*Picea rubens*)-balsam fir (*Abies balsamea*) forested watershed in central Maine, USA. *For. Ecol. Manage.* 222, 234–253.
- Meesenburg, H., Eichhorn, J., Meiwes, K.J., 2009. Atmospheric deposition and canopy interactions. In: Brumme, R., Khanna, P.K. (Eds.), *Ecological Studies 208 – Functioning and Management of European Beech Ecosystems*. Berlin Heidelberg.
- Miller, D.E., Watmough, S.A., 2009. Soil acidification and foliar nutrient status of Ontario's deciduous forest in 1986 and 2005. *Environ. Pollut.* 157, 664–672.
- Moukoui, J., 2006. Effet des essences forestières sur la biodégradation des matières organiques : impacts sur la dynamique et le cycle du carbone, de l'azote et des éléments minéraux. Université Henri Poincaré, Nancy, p. 255.
- Nakata, P.A., 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Sci.* 164, 901–909.
- Nisbet, T.R., Fowler, D., Smith, R.I., 1995. An investigation of the impact of afforestation on stream-water chemistry in the Loch-Dee catchment, SW Scotland. *Environ. Pollut.* 90, 111–120.
- Nys, C., 1987. Fonctionnement du sol d'un écosystème forestier. Etude des modifications dues à la substitution d'une plantation d'épicéa commun (*Picea abies*) à une forêt feuillue mélangée des Ardennes. Université Henri Poincaré, Nancy, 207.
- Nys, C., Ranger, D., Ranger, J., 1983. Comparative study of two forests ecosystems in French primary Ardennes 3. Bioelements content and biological cycle. *Ann. Sci. For.* 40, 41–66.
- Nys, C., Ranger, J., 1988. The consequence of the substitution of tree species on the biogeochemical mechanism of a forest ecosystem – the sulfur cycle. *Ann. Sci. For.* 45, 169–188.
- Oenema, O., Kros, H., de Vries, W., 2003. Approaches and uncertainties in nutrient budgets: implications for nutrient management and environmental policies. *Eur. J. Agron.* 20, 3–16.
- Oren, R., Schulze, E.D., Werk, K.S., Meyer, J., 1988. Performance of two *Picea abies* (L.) Karst. stands at different stages of decline. *Oecologia* 77, 163–173.
- Penninckx, V., Glineur, S., Gruber, W., Herbauts, J., Meerts, P., 2001. Radial variations in wood mineral element concentrations: a comparison of beech and pedunculate oak from the Belgian Ardennes. *Ann. For. Sci.* 58, 253–260.
- Proe, M.F., Midwood, A.J., Craig, J., 2000. Use of stable isotopes to quantify nitrogen, potassium and magnesium dynamics in young Scots pine (*Pinus sylvestris*). *New Phytol.* 146, 461–469.
- Puech, J., 2009. Mise en valeur de la forêt française et développement de la filière bois. Paris, 75.
- Ranger, J., Allie, S., Gelhaye, D., Pollier, B., Turpault, M.P., Granier, A., 2002. Nutrient budgets for a rotation of a Douglas-fir plantation in the Beaujolais (France) based on a chronosequence study. *For. Ecol. Manage.* 171, 3–16.
- Ranger, J., Andreux, F., Bienaimé, S., Berthelin, J., Bonnaud, P., Boudot, J.P., Bréchet, C., Buée, M., Calmet, J., Chaussod, R., Gelhaye, D., Gelhaye, L., Gérard, F., Jaffrain, J., Lejon, D., Le Tacon, F., Lévêque, J., Maurice, J., Merlet, D., Moukoui, J., Munier-Lamy, C., Nourrisson, G., Pollier, B., Ranjard, L., Simonsson, M., Turpault, M.P., Vairrelles, D., Zeller, B., 2004. Effet des substitutions d'essence sur le fonctionnement organo-minéral de l'écosystème forestier, sur les communautés microbiennes et sur la diversité des communautés fongiques mycorrhiziennes et saprophytes (cas du dispositif de Breuil - Morvan), Rapport final contrat INRA-GIP Ecofor 2001-24, No. INRA 1502A. INRA Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (UR 1138), 54280 Champenoux.
- Ranger, J., Discours, D., Mohamed, A.D., Moares, C., Dambrine, E., Merlet, D., Rouiller, J., 1993. Comparison of the gravitational and the capillary water of three spruce (*Picea abies* Karst) stands in the Vosges – usefulness for the identification of the current soil function and consequences for the health status of the stands. *Ann. Sci. For.* 50, 425–444.
- Ranger, J., Marques, R., Colinbelgrand, M., Flammang, N., Gelhaye, D., 1995. The dynamics of biomass and nutrient accumulation in a Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Franco) stand studied using a chronosequence approach. *For. Ecol. Manage.* 72, 167–183.
- Ranger, J., Turpault, M.-P., 1999. Input-output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *For. Ecol. Manage.* 122, 139–154.
- Reiners, W.A., Olson, R.K., 1984. Effects of canopy components on throughfall chemistry – an experimental analysis. *Oecologia* 63, 320–330.
- Reininger, D., Fiala, P., Samek, T., 2011. Acidification of forest soils in the Hruby Jeseník region. *Soil Water Res.* 6, 83–90.
- Saint-André, L., M'Bou, A.T., Mabilia, A., Mouvondy, W., Jourdan, C., Rroupsard, O., Deleporte, P., Hamel, O., Nouvellon, Y., 2005. Age-related equations for above- and below-ground biomass of a Eucalyptus hybrid in Congo. *For. Ecol. Manage.* 205, 199–214.
- Sattoo, T., Madgwick, H., 1982. Forest Biomass. Martinus Nijhoff, The Hague (Netherlands).
- Schöll, L.v., Keltjens, W.G., Hoffland, E., Breemen, N.v., 2004. Aluminium concentration versus the base cation to aluminium ratio as predictors for aluminium toxicity in *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings. *For. Ecol. Manage.* 195, 301–309.
- Seddoh, F.K., 1973. Altération des roches cristallines du Morvan. Etude minéralogique, géochimique et micromorphologique. Université de Dijon, Dijon, 376.
- Sicard, C., Saint-Andre, L., Gelhaye, D., Ranger, J., 2006. Effect of initial fertilisation on biomass and nutrient content of Norway spruce and Douglas-fir plantations at the same site. *Trees-Struct. Funct.* 20, 229–246.
- Staelens, J., Houle, D., De Schrijver, A., Neiryck, J., Verheyen, K., 2008. Calculating dry deposition and canopy exchange with the canopy budget model: review of assumptions and application to two deciduous forests. *Water Air Soil Pollut.* 191, 149–169.
- Stoddard, J.L., Jeffries, D.S., Lukewille, A., Clair, T.A., Dillon, P.J., Driscoll, C.T., Forsius, M., Johannessen, M., Kahl, J.S., Kellogg, J.H., Kemp, A., Mannio, J., Monteith, D.T., Murdoch, P.S., Patrick, S., Rebsdorf, A., Skjelkvåle, B.L., Stainton, M.P., Traaen, T., van Dam, H., Webster, K.E., Wieting, J., Wilander, A., 1999. Regional trends in aquatic recovery from acidification in North America and Europe. *Nature* 401, 575–578.
- Sverdrup, H., Rosen, K., 1998. Long-term base cation mass balances for Swedish forests and the concept of sustainability. *For. Ecol. Manage.* 110, 221–236.
- Sverdrup, H., Thelin, G., Robles, M., Stjernquist, I., Sörensen, J., 2006. Assessing nutrient sustainability of forest production for different tree species considering Ca, Mg, K, N and P at Björnstorps Estate. Sweden *Biogeochem.* 81, 219–238.
- Sverdrup, H., Warfvinge, P., 1988. Weathering of primary silicate minerals in the natural soil environment in relation to a chemical weathering model. *Water Air Soil Pollut.* 38, 387–408.
- Thimonier, A., Dupouey, J.L., Le Tacon, F., 2000. Recent losses of base cations from soils of *Fagus sylvatica* L. stands in northeastern France. *Ambio* 29, 314–321.
- Turpault, M.P., Nys, C., Calvaruso, C., 2009. Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma* 153, 147–154.
- Ulrich, B., 1983. Interaction of forest canopies with atmospheric constituents: SO₂, alkali and earth alkali cations and chloride. In: Ulrich, B., Pankrath, J. (Eds.), *Effects of Accumulation of Air Pollutants in Forest Ecosystems*. D Reidel, Boston, pp. 33–45.

- van der Heijden, G., Legout, A., Midwood, A.J., Craig, C.A., Pollier, B., Ranger, J., Dambrine, E., in press. Plant and Soil. Mg and Ca root uptake and vertical transfer in soils assessed by an in situ ecosystemscale multi-isotopic (^{26}Mg & ^{44}Ca) tracing experiment in a beech stand (Breuil-Chenue, France). *Plant Soil*.
- van der Heijden, G., Legout, A., Nicolas, M., Ulrich, E., Johnson, D.W., Dambrine, E., 2011. Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change. *For. Ecol. Manage.* 261, 730–740.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Bréchet, C., Ranger, J., Dambrine, E., 2013. Tracing and modeling preferential flow in a forest soil – Potential impact on nutrient leaching. *Geoderma* 195–196, 12–22.
- Vuorenmaa, J., 2004. Long-term changes of acidifying deposition in Finland (1973–2000). *Environ. Pollut.* 128, 351–362.
- Warby, R.A.F., Johnson, C.E., Driscoll, C.T., 2007. Continuing acidification of organic soils across the northeastern USA: 1984–2001. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73, 274–284.
- Warfvinge, P., Sverdrup, H., 1992. Calculating critical loads of acid deposition with PROFILE – a steady-state soil chemistry model. *Water Air Soil Pollut.* 63, 119–143.
- Watmough, S.A., Aherne, J., Alewell, C., Arp, P., Bailey, S., Clair, T., Dillon, P., Duchesne, L., Eimers, C., Fernandez, I., Foster, N., Larssen, T., Miller, E., Mitchell, M., Page, S., 2005. Sulphate, nitrogen and base cation budgets at 21 forested catchments in Canada, the United States and Europe. *Environ. Monit. Assess.* 109, 1–36.
- Watmough, S.A., Dillon, P.J., 2003. Base cation and nitrogen budgets for a mixed hardwood catchment in South-Central Ontario. *Ecosystems* 6, 675–693.
- Weatherall, A., Proe, M.F., Craig, J., Cameron, A.D., Midwood, A.J., 2006. Internal cycling of nitrogen, potassium and magnesium in young Sitka spruce. *Tree Physiol.* 26, 673–680.
- Yanai, R.D., Battles, J.J., Richardson, A.D., Blodgett, C.A., Wood, D.M., Rastetter, E.B., 2010. Estimating uncertainty in ecosystem budget calculations. *Ecosystems* 13, 239–248.
- Yanai, R.D., Blum, J.D., Hamburg, S.P., Arthur, M.A., Nezat, C.A., Siccama, T.G., 2005. New insights into calcium depletion in northeastern forests. *J. For.* 103, 14–20.

Online resource 1 : Adjusted parameters for the mineralmass allometric equations

Adjusted Parameters	N <i>kg</i>	P <i>kg</i>	K <i>kg</i>	Ca <i>kg</i>	Mg <i>kg</i>
a	1.741E-07	6.751E-09	6.493E-08	2.710E-07	7.427E-09
b	2.2386	2.3722	2.3159	2.0245	2.3430

Online resource 2 : Na, Cl, Ca, Mg and K concentrations measured in the soil solution under beech in comparison with predicted values calculated from the PROFILE model.

		Na ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺
		<i>μmol_c.L⁻¹</i>				
Measured	15cm	36.5	45.4	12.4	12.3	5.4
	30cm	44.9	49.9	8.8	11.9	5.1
	60cm	47.8	49.8	10.6	11.4	10.2
PROFILE predicted	15cm	35.25	39.09	18.71	11.10	11.48
	30cm	44.17	43.36	12.15	13.20	7.01
	60cm	49.25	45.86	13.12	15.48	9.36

Chapitre V – Développement méthodologique pour l’analyse des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ par ICP- MS. Premiers résultats de l’expérience de traçage isotopique

L’expérience de multi-traçage isotopique a nécessité des protocoles d’analyses isotopiques efficaces (compromis entre précision et rapidité d’analyses). Ce chapitre présente le développement méthodologique des analyses isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ avec ICP-MS et les premiers résultats de l’expérience de multi-traçage isotopique un an après l’application des traceurs

I. Résumé de l'étude

I.1. Introduction

L'expérience de multi-traçage isotopique *in situ* à l'échelle d'un écosystème forestier génère une grande quantité d'échantillons à analyser pour caractériser proprement la variabilité spatiale et temporelle des dynamiques de nos traceurs isotopiques (voir le chapitre « Matériel et méthodes »). Les échantillons prélevés lors de cette expérience de multi-traçage sont de trois grands types : (1) des solutions environnementales (pluie hors et sous-couvert, solutions de sol à différentes profondeurs, eaux liées, eaux gravitaires), (2) des extractions de sol (extractions CEC et biomasse microbienne avec l'acétate d'ammonium comme extractant) et (3) des échantillons de biomasse végétale minéralisés avec de l'acide nitrique.

Les rapports isotopiques du magnésium et du calcium d'échantillons environnementaux (les trois types d'échantillons précédemment cités) ont déjà été analysés avec des spectromètres de masse de type MC-ICP-MS et TIMS. Cependant, les temps d'analyse sont très longs et une purification chimique préalable des échantillons est requise pour ces types d'instruments. Une alternative possible est l'utilisation de spectromètres de masse de type ICP-MS. Ce type d'instrument est moins précis que la MC-ICP-MS ou la TIMS pour les analyses de rapports isotopiques mais les temps d'analyse sont courts et les échantillons ne requièrent souvent pas ou peu de préparation. Les rapports isotopiques du Mg et du Ca ont déjà été mesurés par ICP-MS dans plusieurs études utilisant des techniques de traçage isotopiques (Weatherall *et al.*, 2006b, a; Weatherall *et al.*, 2006c; Becker *et al.*, 2008; Augusto *et al.*, 2011) mais ces études se sont focalisées sur des échantillons de biomasse végétale.

La connaissance de la précision, la répétabilité et de la justesse des mesures des rapports isotopiques est essentiel pour définir l'incertitude autour d'une valeur mesurée et ainsi définir une limite de détection des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca (enrichissement isotopique au-delà duquel on peut dire avec certitude que l'enrichissement mesurée est liée à la présence du traceur isotopique et pas simplement aux variations naturelles des rapports isotopiques ou à l'incertitude de mesure). La limite de détection des traceurs isotopiques permet de calculer les quantités nécessaires de matériel isotopiquement enrichi à apporter pour marquer un pool et/ou tracer un flux de manière efficace et est donc essentiel pour le plan d'expérimentation d'expériences de traçage isotopique. Peu d'études ont quantifié la précision, la répétabilité et la justesse des mesures isotopiques par ICP-MS. Becker *et al.* (2008) ont néanmoins déjà mesuré la précision d'analyse des rapports $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ sur un instrument Agilent. Les performances analytiques des ICP-MS varient entre instruments (de même marque et de marque différentes) et sont dépendantes des paramètres instrumentales (paramètres du plasma, extraction ionique, gaz de collision/réaction, paramètres du détecteur...). Enfin, les mesures de rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ de matériel enrichi n'ont jamais été validées à notre connaissance car il n'existe pas de standard de composition isotopique enrichi pour ces isotopes.

Ce chapitre a pour objectifs premiers de développer et valider les méthodes d'analyses des rapports isotopiques du Mg et du Ca pour les trois types d'échantillons précédemment cités, quantifier l'incertitude de mesures de ces méthodes et déterminer une limite de détection des

traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca . Ce chapitre présente également les premiers résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique (transfert vertical des traceurs dans le sol et prélèvements des traceurs par les racines fines.) et discute la validité de l'expérimentation.

I.2. Principaux résultats

I.2.1. Développement et validation des méthodes d'analyses isotopiques

Pour la mesure des rapports isotopiques du Mg, la réponse du détecteur n'est pas linéaire en fonction de la concentration en magnésium de l'échantillon mais est linéaire en fonction du $\delta^{26}\text{Mg}$ de l'échantillon pour des $\delta^{26}\text{Mg}$ variant de 0‰ à 20 000‰. Pour la mesure des rapports isotopiques du Ca, la réponse du détecteur est linéaire en fonction de la concentration pour des concentrations supérieures à 100ppb de Ca mais n'est pas linéaire en fonction du $\delta^{44}\text{Ca}$ de l'échantillon.

La non-linéarité du détecteur peut engendrer des biais lors de la correction du fractionnement instrumental si les standards servant pour contrôler la dérive temporelle du fractionnement instrumental ne sont pas à la même concentration de Mg et/ou de Ca que les échantillons ou si ces standards ont une composition isotopique en Ca différente des échantillons. Ces résultats montrent donc la nécessité de diluer ou évaporer les échantillons de manière à obtenir une même concentration (100 ppb) pour tous les échantillons et standards pour la mesure des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$. Ces résultats montrent aussi la nécessité d'utiliser deux standards (un standard non-enrichi et un standard enrichi) pour corriger le fractionnement instrumental lors de la mesure des rapports isotopiques $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$.

Les interférences potentielles sur les masses 24, 26, 40 et 44 ont toutes été testées mais la plupart ne sont pas significatives : le biais induit par l'interférence sur le rapport isotopique était inférieure à la précision de mesure. Pour $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, seul le potassium et le strontium à forte concentration par rapport au calcium sont une source d'interférence sur le rapport isotopique $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$. Ces rapports de concentrations (K/Ca et Sr/Ca) sont peu probables dans les échantillons de la placette de traçage. Pour $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$, seul le carbone et l'azote à forte concentration par rapport au magnésium sont une source d'interférence sur le rapport isotopique $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$. De tels rapports de concentrations sont peu probables dans les échantillons de solutions et de biomasse végétale mais ces interférants sont problématiques dans les solutions d'extractions de sol (acétate d'ammonium) ce qui justifie la minéralisation de l'acétate d'ammonium avant analyse.

La méthode d'analyse des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ a été validée en mesurant les même échantillons sur un système ICP-MS différent : Agilent 7500CE. La méthode d'analyse des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ a aussi été validée en mesurant les même échantillons sur un système TIMS. La précision, la répétabilité et la justesse des analyses isotopiques avec le système Bruker 820MS sont résumées dans le Tableau.

	Précision	Répétabilité	Justesse
$^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$	2.0	2.0	0.7
$^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$	3.2	3.7	1.2

Table V-1 : Précision, répétabilité et justesse des analyses isotopiques du Mg et du Ca avec un système Bruker 820MS exprimées en $\delta^{26}\text{Mg}$ et $\delta^{44}\text{Ca}$ (‰).

I.2.2. Résultats préliminaires de l'expérience de multi-traçage isotopique

I.2.2.1. Transfert vertical de traceurs dans le sol

Un an après l'apport de la solution de traçage au sol (mars 2010), les traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca ont été retrouvés à des profondeurs différentes dans le sol. L'horizon superficiel (0-5cm) était le plus enrichi en ^{26}Mg et ^{44}Ca ($\sim 660\text{‰}$ et $\sim 370\text{‰}$). Les valeurs de $\delta^{26}\text{Mg}$ et $\delta^{44}\text{Ca}$ ont diminué avec la profondeur mais de faibles valeurs ont été trouvées dans des horizons profonds : $\sim 80\text{‰}$ et $\sim 45\text{‰}$ respectivement dans l'horizon 25-40cm. La composition isotopique de l'humus était encore très enrichie : $\delta^{26}\text{Mg} \approx 250\text{‰}$ et $\delta^{44}\text{Ca} \approx 450\text{‰}$.

Les résultats de simulation du transfert des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca dans le profil de sol avec le modèle IsoMod (initialement développé pour réfléchir le plan d'expérimentation) sont différents des résultats expérimentaux.

La rétention de traceurs dans la couche de litière au sol n'est pas prise en compte par le modèle. En conséquence, le modèle a surestimé la quantité de traceur dans l'horizon superficiel du sol (0-5cm). Le modèle a sous-estimé les quantités de traceurs dans les horizons plus profonds (>10cm de profondeur). Il est possible qu'une part des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca soit transférée rapidement vers des couches de sol plus profondes avec les écoulements préférentiels d'eau.

I.2.2.2. Prélèvement racinaire des traceurs dans le sol

Le suivi de l'enrichissement isotopique des racines fines et des pools échangeables autour de ces racines a permis d'étudier les sources de magnésium et de calcium pour le prélèvement racinaire. Les enrichissements isotopiques des racines fines et des pools échangeables sont corrélés : $p < 0.0001$ et $R^2 = 0.449$ pour Mg et $p < 0.0001$ et $R^2 = 0.585$ pour Ca. Ceci met en évidence que les pools échangeables sont une des principales sources de magnésium et de calcium pour le prélèvement racinaire. Cependant, les enrichissements isotopiques ($\delta^{26}\text{Mg}$) des racines fines sont inférieurs aux $\delta^{26}\text{Mg}$ du pool échangeable. Cette différence peut être expliquée par :

- i. une ou plusieurs sources de prélèvement racinaire autres que le pool échangeable (matière organique, altération minérale, biomasse microbienne du sol, prélèvement profond)
- ii. une dilution isotopique du Mg prélevé par un flux de Mg de composition isotopique proche de l'abondance naturelle via le phloème.

II. $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ isotope ratio analysis with ICP-MS – Method development and validation

Gregory van der Heijden^{(1)*}, Arnaud Legout⁽¹⁾, Andrew J. Midwood⁽²⁾, Carol-Ann Craig⁽²⁾,
Benoît Pollier⁽¹⁾, Jacques Ranger⁽¹⁾, Etienne Dambrine⁽³⁾

(1) INRA – UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes forestiers, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France

(2) The James Hutton Institute – Analytical Group, Craigiebuckler, Aberdeen AB15 8QH, Scotland United Kingdom

(3) INRA – UMR 042 CARTELE, Université de Savoie, Centre Interdisciplinaire Scientifique de la Montagne, Belledonne 226, 73376 Le Bourget-du-Lac Cedex

*Corresponding author

Tel : 03 83 39 73 27

Fax : 03 83 39 40 76

gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr

Introduction

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been applied to isotope ratio measurements in tracer studies (Becker et al. 2008; Weatherall et al. 2006a; b; Weatherall et al. 2006c) due to its excellent sensitivity, precision and good accuracy. ICP-MS has certain advantages over thermal ionization mass spectrometry (TIMS) for example, with short analysis times, typically a few minutes per sample, and in some cases little sample preparation. ICP-MS systems maintenance and purchase costs are also lower. However, ICP-MS is a less precise and accurate method than TIMS or multi-collector ICP-MS (MC-ICP-MS). It is important to refine methods to reduce analysis costs (material use, sample preparation) but optimize the value of the tracing experiment (precision and accuracy).

The scope of the study was to determine analytical methods to measure isotope ratios with ICP-MS in different sample types collected at the tracing experiment site, determine analytical precision, repeatability and accuracy of these methods. For this purpose, ICP-MS detector linearity was checked for both sample elemental concentration and sample isotope enrichment. Two different mass bias correction methods were tested (standard bracketing using one or two standards). 30 samples from the tracing experiment carried out in the 35-yr-old beech plot at the Breuil-Chenue experimental site in April 2010 were selected and Mg and Ca isotope ratios were analyzed with two different ICP-MS systems. Mg isotope ratios were also analyzed with a TIMS system.

Material and methods

ICP analysis was conducted using a Bruker 820MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). However, in order to determine precision, repeatability, accuracy and validate isotope ratio results measured in tracing experiment samples, we first assessed analytical bias (spectral interferences, mass bias and detector response linearity) on ICP-MS. A selection of samples was analysed on two different ICP-MS systems: Bruker 820MS and Agilent 7500CE (Agilent Technologies, Cheshire, UK). $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ results were also compared to those measured with a TIMS system.

Measured isotopic compositions of samples are expressed with the absolute value of the isotope ratio ($^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) or in permil deviations relative to the Mg and Ca reference ratios (DSM3 and NIST SRM 915a respectively):

$$\delta^{26/24}\text{Mg} = \left\{ \left(\frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3}} - 1 \right\} \times 1000$$
$$\delta^{44/40}\text{Ca} = \left\{ \left(\frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{NIST915a}} - 1 \right\} \times 1000$$

Analytical biases

^{26}Mg and ^{44}Ca in-house enriched standards (hereafter referred to as *spiked standards*) were created by spiking Merck Titrisol® Mg and Ca standards, with highly enriched compounds (99.3 ^{26}Mg atom% and 96.4 ^{44}Ca atom%) to obtain isotopic ratios within the range of expected values from the field experiment (Table 1). Linearity of detector response with sample concentration and isotopic enrichment was tested with a set of standards ranging from 5 to 1000ppb and with a set of standards of different isotopic composition (Table 1).

Standard	Mg		Standard	Ca	
	$^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$	$\delta^{26}\text{Mg} \text{‰}$		$^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$	$\delta^{44}\text{Ca} \text{‰}$
Mg-D50	0.1650	184	Ca-D50	0.0417	944
Mg-D25	0.1917	375	Ca-D25	0.0628	1927
Mg-D10	0.2788	1000	Ca-D10	0.1314	5125
Mg-D5	0.4526	2247	Ca-D5	0.2676	11472
Mg-D2	1.3846	8934	Ca-D2	0.9799	44669
Mg-D4/3	3.0136	20621	Ca-D4/3	2.1570	99529
Mg-D1	152.25	1091297	Ca-D1	27.089	1261525

Table V-2 : Calcium and magnesium isotopic composition of ^{44}Ca and ^{26}Mg enriched standards made from ^{44}Ca and ^{26}Mg -spiked standards (calculated ratios).

Precision, repeatability and accuracy

We selected three different sample types to be analysed on both ICP-MS and TIMS systems: soil solutions, soil CEC extractions (ammonium acetate; 1M) and vegetation digests. For each of the sample types, 10 samples covering a wide range of isotopic ratios from low ^{44}Ca or ^{26}Mg -spiked samples (25‰ to 100‰) to high spiked samples (2000‰) were selected. No enriched biomass samples from the Breuil site were available when the instrument comparison study was carried out. Biomass samples were obtained from a separate experiment conducted in Scotland, UK and described fully by Weatherall et al. (2006a; b; 2006c). Ammonium acetate at high concentrations is a source of spectral interferences on ^{24}Mg ($^{12}\text{C}^{12}\text{C}$) and ^{26}Mg ($^{12}\text{C}^{14}\text{N}$). For this reason, ammonium acetate from soil CEC extractions was digested using peroxide: 10mL of the initial sample was evaporated in polypropylene bottles; 2.5mL peroxide (30% volumetric concentration) was added. The bottles were then capped and left three days at 65°C. The remaining peroxide was then evaporated and 10mL of Millipore water was added. Here we define internal precision as the analytical ($\pm 1 \sigma_{n-1}$) standard deviation of sample analysis. Accuracy is defined as the difference between measured and a reference isotope ratio (certified ratio or TIMS measured ratio) and repeatability is defined as the ($\pm 1 \sigma_{n-1}$) standard deviation of repeated measures of the same sample.

Instruments

To measure ^{40}Ca and avoid interference from ^{40}Ar an octopole reaction cell system and a collision-reaction interphase was used on respectively the Agilent and the Bruker system. Prior to ICP-MS analysis, all samples were diluted to 100ppb Ca and Mg samples and acidified (1% HNO_3). TIMS analysis was performed using a VG Sector 54 Instrument (VG Instruments, Cheshire UK). Before measuring isotopic ratios on TIMS, samples were purified with cation resin columns AG50W-X8 (200-400 Mesh), following the two stage HCl protocol (Wombacher et al. 2009). Rhenium filaments were used for the $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ analysis: 1µl of a silica gel /phosphoric acid suspension was added to the filament and dried. The sample, 1-2µg of Mg in 1µl of 0.5M HCl was then added and dried down. A static data collection routine was used for the isotope ratio analysis, utilizing 3 Faraday collectors on the instrument.

Mass bias correction methods

The total mass bias in a mass spectrometer can be experimentally determined by the mass bias factor f_{MB} , where $R_{measured}$ is the measured isotope ratio of a standard and $R_{certified}$ is the certified or accepted value of the standard:

$$f_{MB} = \frac{R_{measured}}{R_{certified}} - 1$$

On TIMS, the $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ ratio was monitored and the mass bias of the sample was determined against the terrestrial $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ reference values of 0.12663 using an exponential law (Midwood et al. 2000; Stegmann et al. 1996). On ICP-MS, two mass bias correction methods were tested: i) the commonly used standard bracketing method using one natural abundance standard (hereafter referred to as the single standard bracketing method) assuming that mass bias drift is linear over time and that detector response is linear with sample isotope enrichment (Augusto et al. 2011; Becker et al. 2008; Bolou-Bi et al. 2010; Bolou-Bi et al. 2009; Galy et al. 2003; Tipper et al. 2008; Weatherall et al. 2006a; b; Weatherall et al. 2006c), and ii) a standard bracketing method using two standards of different isotopic composition (hereafter referred to as the double standard bracketing method). The double standard bracketing method corrects for total mass bias by calibrating mass bias over a range of isotope ratios with the two standards (linear interpolation).

Instrument comparison statistical tool

Agreement between two methods of measurement can be quantified using the differences between observations made using two methods on the same samples. The 95% limits of agreement, estimated by mean difference \pm 1.96 standard deviation of the differences, provide an interval within which 95% of differences between measurements by the two methods are expected to lie. This method is referred to as the Bland-Altman method. Results are usually represented in a Bland-Altman plot in which differences between the two methods (bias) are plotted against the mean value of the two methods for each sample (Bland and Altman 1999).

Results

Detector linearity

Detector linearity with sample concentration or isotopic composition is essential. Indeed, if detector response is non-linear analytical biases may be induced when correcting for instrument total mass bias. Detector linearity with sample concentration was tested with a set of NIST standards with concentrations ranging from 5 to 1000 ppb on the two ICP-MS systems (Agilent and Bruker). Detector response was in general linear for both isotopes above 100 ppb (Figure 1.a). However, for the Bruker system, the mass bias factor for Mg increased slightly with an increase in concentration from 100 to 1000 ppb.

Detector linearity with sample isotopic enrichment was tested with a set of in-house standards (Figure 1.b). Measured mass bias factors were constant and close to 0 for $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ ratios ranging from 0.139 to 3 (-0.86 to 0.47 on the \log_{10} scale) for both instruments but decreased strongly for the highly ^{26}Mg -enriched standard ($^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg} \sim 152$). For both

instruments, $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ measured mass bias factors were strongly related to the enrichment of the measured standard: the higher the ^{44}Ca -enrichment the lower the mass bias factor. Mass bias factors for low enriched standards were close to 0 but decreased down to -0.9 for the highly enriched standard.

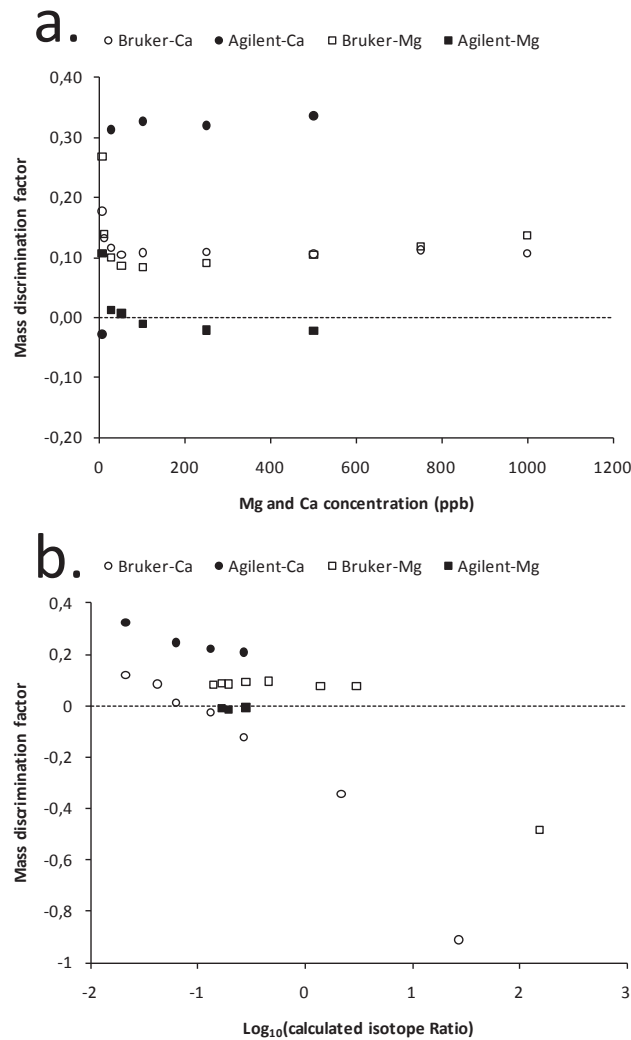


Figure V-1 : Influence of sample concentration (2.a) and isotope enrichment (2.b) on measured mass bias factors. Standards of different concentrations were made from NIST standards and standards of different isotopic composition were made from ^{26}Mg and ^{44}Ca spiked NIST standards at 100 ppb Mg or Ca on both ICP-MS (Agilent and Bruker).

Total mass bias correction methods on ICP-MS

For Mg, both mass bias correction methods (single standard and double standard bracketing) were tested on ICP-MS using all three sample types and compared to the values measured using the TIMS system (reference ratio). Use of the double standard bracketing method marginally improved the accuracy of the data: the single standard bracketing method generated a 0.27% mean error while the double standard method generated a 0.03% mean error.

At 100ppb concentrations and the given ICP-MS optimization parameters, measured mass bias factors for Ca were related to sample isotope enrichment for both instruments (Figure 1.b). The Ca-D50 was used to assess the efficiency of the double standard bracketing method as its isotopic composition was known and fell between that of the two standards (NIST SRM915b and Ca-D25) used for the bracketing method (Table 1). When correcting mass bias with the single standard bracketing method, measured isotope ratios were underestimated (7.5% relative error). When correcting mass bias with the double standard bracketing method, measured isotope ratios were also underestimated but closer to the reference value (1.0% relative error).

Hereafter, all ICP-MS results are presented corrected for mass bias with the double standard bracketing method for Mg and Ca ratios and both instruments.

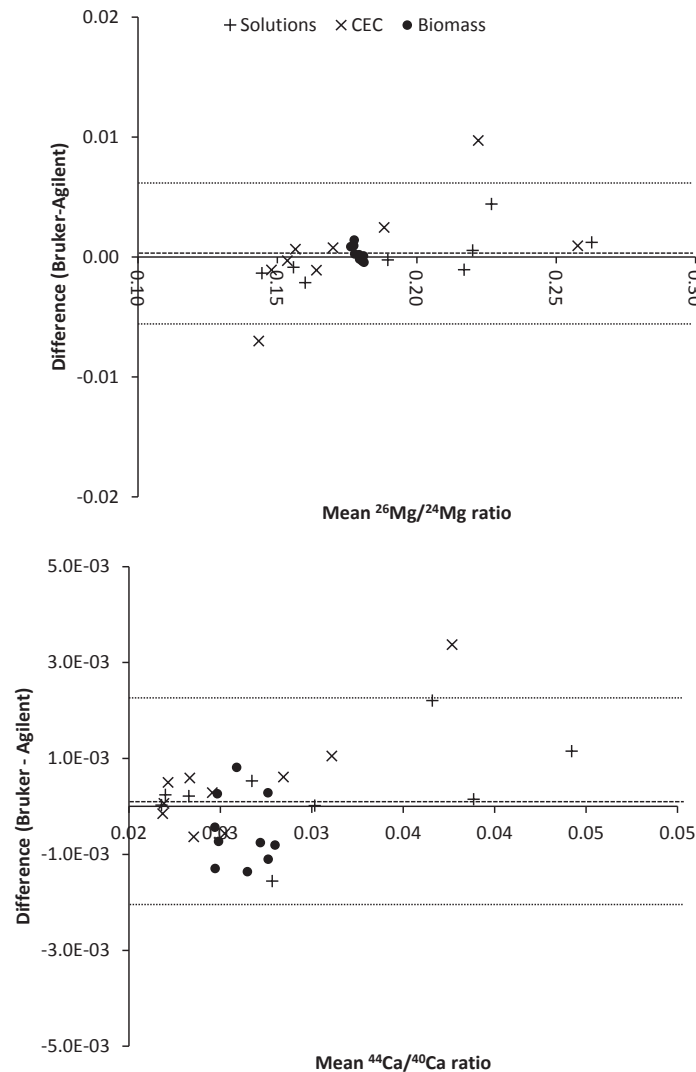


Figure V-2 : Bland-Altman plots for measuring agreement in instrument comparison. Differences between the Mg and Ca isotope ratios measured on Bruker 820MS and Agilent 7500CE are plotted against the mean value of both measurements. Dotted lines represent the upper and lower 95% limits of agreement ($\text{mean} \pm 1.96\text{SD}$) and the mean difference.

Instrument precision, accuracy and repeatability

Isotope ratio analysis results from the two ICP-MS instruments were compared using the Bland-Altman method (Figure 2). For $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ ratios, most differences between measured

isotope ratios for each sample fell between the upper and the lower 95% limits of agreement and the mean difference between instrument results was close to 0 ($1.51\text{E-}03 \pm 3.55\text{E-}03$). Only two samples (CEC extraction samples) were outside of the 95% limits of agreement. For $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ ratio, again, most differences between instruments were confined to the 95% limits of agreement and the mean difference was close to 0 ($9.98\text{E-}05 \pm 1.10\text{E-}03$). Only one sample (CEC extraction sample) was outside of the 95% limits of agreement.

$^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ isotope ratio precision was equivalent for both ICP-MS systems: approximately 0.21% and 0.33% respectively (Table 2). However precision was higher for the Bruker system and this for both Ca and Mg. Repeatability values were also mostly below 0.5% save for Ca ratios measured with Agilent 7500CE series. Precision and repeatability were higher for Mg isotope analysis than for Ca. Isotope ratio analysis precision and repeatability were slightly higher for the Bruker system for all sample types and both Mg and Ca. However precision and repeatability for NIST and spiked standards were equivalent for both ICP-MS systems.

$^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ ratio analysis accuracy was only assessed with the NIST and spiked standards and was on average respectively -0.27% to -0.12% for the Agilent and the Bruker system. For $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ ratios, instrument accuracy varied between the different sample types and standards. Accuracy ranged from -0.71% to +0.75% for the Agilent system and from -0.52% to +0.56% for the Bruker system. However, mean measurement accuracies (*i.e.* computed for all samples and standards) were low (0.06% for the Agilent system and 0.07% for the Bruker system). Overall, measured ratios were always within 1% and generally within 0.5% of the reference ratio for all samples and both Mg and Ca.

Discussion

This study presents new results in the application of ICP-MS to environmental isotope tracer measurements. The determination of isotope ratios of the different standards showed that mass bias estimation on ICP-MS may depend on many factors: interferences, detector non-linearity (concentration and isotope enrichment effect). Guidelines are proposed below for precise isotope ratio measurements for tracer studies.

To control biases due to interferences and/or detector non-linearity, we recommend defining a fixed concentration for isotope ratio analysis. In this current study, we choose to dilute all samples to 100ppb Mg and 100ppb Ca as isotope ratio measurements were the least biased at these concentrations and sample concentrations were generally close to 100ppb.

Mass bias correction using the single standard bracketing method was proved to be insufficient to correctly estimate Ca isotope ratios for enriched samples because detector response was not linear with isotope enrichment. We thus recommend the use of two standards (natural abundance and enriched standards) to simultaneously correct for mass bias and detector response biases when measuring $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ with ICP-MS systems. Although Mg isotope analysis accuracy was slightly better when isotope ratios were corrected with the double standard bracketing method, the gain in accuracy was small. The single standard bracketing method yielded sufficiently accurate results for Mg tracer study samples because the samples analysed had fairly low $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ isotopic enrichments. However detector response becomes

non-linear for highly enriched samples (Figure 1.b). A double standard bracketing method would thus be required for highly ^{26}Mg -enriched samples.

Sample type	Mg						Ca					
	Agilent		Bruker				Agilent		Bruker			
	P	R	A	P	R	A	P	R	A	P	R	A
Mean	0.22	0.48	0.06	0.20	0.20	0.07	0.33	1.12	-0.27	0.32	0.37	-0.12
Solutions	0.27	0.42	-0.71	0.21	0.17	-0.52	0.30	1.14		0.39	0.49	
CEC-extractions	0.24	0.81	0.29	0.23	0.28	0.14	0.42	1.51		0.33	0.28	
Biomass Digests	0.19	0.17	0.75	0.16	0.10	0.56	0.36	0.79		0.30	0.32	
NIST Standards	0.20	0.15	0.06	0.18	0.19	0.33	0.32	0.97	-0.46	0.33	0.43	-0.11
Spiked standards	0.21	0.15	0.08	0.17	0.21	0.21	0.26	0.58	-0.07	0.26	0.27	-0.12

Table V-3 : Instrument precision (P), repeatability (R), and accuracy (A) assessed for each sample type for the two ICP-MS instruments (Agilent 7500CE series and Bruker 820MS). "All samples" refers to Solution, CEC-extraction and Biomass digest samples. Precision was estimated by the standard deviation of measurement replicates of one analysis. For repeatability, each sample was analyzed 3 times on 3 different days. Isotope analysis accuracy (Error) was defined as the deviation (%) from TIMS measured ratio or certified ratio. Isotope ratios were corrected for mass bias using the double standard bracketing method.

Few studies have determined the capacity of ICP-MS to accurately measure isotopically enriched materials (Becker et al. 2008; Patterson et al. 1999). Both instruments provided precise, repeatable and accurate measurements of standards (Table 2). Results for Mg and Ca isotope analysis with both ICP-MS systems were very similar (Figure 2) and $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ TIMS results also showed that both instruments were accurate when measuring different sample types (*i.e.* different matrixes) (Table 2). The comparison of different instruments with different optimization parameters validates the isotope ratio analysis methodology on ICP-MS systems.

Although other instruments (TIMS or MC-ICP-MS) are much more accurate, the main advantages of ICP-MS coupled with a quadrupole is less sample preparation and shorter analysis times which enable to reduce analysis costs and increase the number of samples analysed. Furthermore, ICP-MS instruments are much less expensive to purchase and maintenance costs are also lower. The lower accuracy of ICP-MS is more than acceptable for tracer study requirements: the labeling technique induces large differences in isotopic composition between ecosystem compartments, differences which are greater than ICP-MS precision and accuracy.

Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca in the different ecosystem compartments is estimated from the difference between the measured enriched isotope ratio of the compartment and the isotope ratio in natural conditions (control). Isotope ratio analysis with ICP-MS is not precise and accurate enough to measure natural isotope variations. Since natural $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ isotope variations in forest ecosystems reported so far are relatively small (Bolou-Bi et al. 2010; Bolou-Bi et al. 2012; Bolou Bi 2009; Genki-Tok et al. 2009; Cobert et al. 2011a; Cobert et al. 2011b; Farkaš et al. 2011; Hindshaw et al. 2012; Hindshaw et al. 2011; Holmden and Bélanger 2006; Holmden and Bélanger 2010; Page et al. 2008; Schmitt 2003; Wiegand et al. 2005), we assume that the isotopic composition in natural conditions (control) is 0‰. However, DePaolo (2004) showed that rocks formed during the Precambrian and with high initial K/Ca ratios would accumulate a significant amount of radiogenic ^{40}Ca from the decay of ^{40}K over time. This in turn may induce negative $\delta^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ values. The granite bedrock at the Breuil experimental site was formed 296 ± 5 Ma years ago (Viallette 1962 ; 1965). Given the half-life of ^{40}K (1.25Ga), it is unlikely that radiogenic ^{40}Ca would induce very low $\delta^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ at our site. Assuming that Ca

natural isotope compositions are 0‰ at our site should not induce significant errors when estimating excess ^{44}Ca .

Conclusion

$^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ isotope ratios were successively measured with ICP-MS Bruker 820MS. Because of detector non-linearity with sample Mg and Ca concentration, all samples were analyzed at a constant concentration (100ppb Mg or Ca). Detector response was not linear with sample ^{44}Ca isotope enrichment. This was corrected for by applying a double standard bracketing technique to correct for total mass bias in the mass spectrometer. Measurement precision (0.2% and 0.3% for $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ respectively) and accuracy (0.1% for both $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) were sufficient for tracer study samples. Given natural isotope variations and ICP-MS precision, repeatability and accuracy, we set the ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer detection limit at 10‰.

Reference list

- Augusto L, Zeller B, Midwood A J, Swanston C, Dambrine E, Schneider A and Bosc A 2011 Two-year dynamics of foliage labelling in 8-year-old *Pinus pinaster* trees with (^{15}N), (^{26}Mg) and (^{42}Ca)-simulation of Ca transport in xylem using an upscaling approach. *Ann For Sci* 68, 169-178.
- Becker J S, Fullner K, Seeling U D, Fornalczyk G and Kuhn A J 2008 Measuring magnesium, calcium and potassium isotope ratios using ICP-QMS with an octopole collision cell in tracer studies of nutrient uptake and translocation in plants. *Anal Bioanal Chem* 390, 571-578.
- Bland J M and Altman D G 1999 Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical methods in Medical Research* 8, 135-160.
- Bolou-Bi E B, Poszwa A, Leyval C and Vigier N 2010 Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geochim Cosmochim* 74, 2523-2537.
- Bolou-Bi E B, Vigier N, Brenot A and Poszwa A 2009 Magnesium Isotope Compositions of Natural Reference Materials. *Geostandards and geoanalytical research* 33, 95-109.
- Bolou-Bi E B, Vigier N, Poszwa A, Boudot J P and Dambrine E 2012 Effects of biogeochemical processes on magnesium isotope variations in a forested catchment in the Vosges Mountains (France). *Geochim Cosmochim* 87, 341-355.
- Bolou Bi E 2009 Etude du rôle de la végétation dans le cycle biogéochimique du magnésium: approche isotopique. p. 286. Université Henri Poincaré, Nancy.
- Centi-Tok B, Chabaux F, Lemarchand D, Schmitt A-D, Pierret M-C, Viville D, Bagard M-L and Stille P 2009 The impact of water-rock interaction and vegetation on calcium isotope fractionation in soil- and stream waters of a small, forested catchment (the Strengbach case). *Geochim Cosmochim* 73 2215-2228.
- Cobert F, Schmitt A-D, Calvaruso C, Turpault M-P, Lemarchand D, Collignon C, Chabaux F and Stille P 2011a Biotic and abiotic experimental identification of bacterial influence on calcium isotopic signatures. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM 25, 2760-2768.
- Cobert F, Schmitt A D, Bourgeade P, Labolle F, Badot P M, Chabaux F and Stille P 2011b Experimental identification of Ca isotopic fractionations in higher plants. *Geochim Cosmochim* 75, 5467-5482.
- DePaolo D J 2004 Calcium isotopic variations produced by biological, kinetic, radiogenic and nucleosynthetic processes. In *Geochemistry of Non-Traditional Stable Isotopes*. Eds. C M Johnson, B L Beard and F Albarede. pp 255-288. Mineralogical Soc America, Washington.
- Farkaš J, Déjeant A, Novák M and Jacobsen S B 2011 Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca^{2+} in a base-poor forest: A new concept of combining stable ($\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$) and radiogenic (ϵCa) signals. *Geochim Cosmochim* 75, 7031-7046.
- Galy A, Yoffe O, Janney P E, Williams R W, Cloquet C, Alard O, Halicz L, Wadhwa M, Hutcheon I D, Ramon E and Carignan J 2003 Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM980 and new reference materials for magnesium-isotope-ratio measurements. *J Anal Atom Spectrom* 18, 1352-1356.
- Hindshaw R, Reynolds B, Wiederhold J, Kiczka M, Kretzschmar R and Bourdon B 2012 Calcium isotope fractionation in alpine plants. *Biogeochemistry*, 1-16.
- Hindshaw R S, Reynolds B C, Wiederhold J G, Kretzschmar R and Bourdon B 2011 Calcium isotopes in a proglacial weathering environment: Damna glacier, Switzerland. *Geochim Cosmochim* 75, 106-118.
- Holmden C and Bélanger N 2006 Calcium isotope fractionation in a boreal forest ecosystem. *Geochim Cosmochim* 70, A261-A261.
- Holmden C and Bélanger N 2010 Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochim Cosmochim* 74, 995-1015.
- Midwood A J, Proe M F and Harthill J J 2000 Use and analysis by thermal ionisation mass spectrometry of Mg-26 and K-41 to assess mineral uptake in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Analyst* 125, 487-492.
- Page B D, Bullen T D and Mitchell M J 2008 Influences of calcium availability and tree species on Ca isotope fractionation in soil and vegetation. *Biogeochemistry* 88, 1-13.
- Patterson K Y, Veillon C, David Hill A, Moser-Veillon P B and O'Haver T C 1999 Measurement of calcium stable isotope tracers using cool plasma ICP-MS. *J Anal Atom Spectrom* 14, 1673-1677.

- Schmitt A-D 2003 Les isotopes du calcium: développements analytiques, application au bilan océanique présent et passé. In Science de la Terre et de l'Univers. p. 200. Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Stegmann W, Goldstein S and Georgieff M 1996 Determination of isotope enrichments of magnesium in microwave-digested biological samples by thermal ionization mass spectrometry using a direct loading technique. *Analyst* 121, 901-904.
- Tipper E T, Louvat P, Capmas F, Galy A and Gaillardet J 2008 Accuracy of stable Mg and Ca isotope data obtained by MC-ICP-MS using the standard addition method. *Chem Geol* 257, 65-75.
- Vialette Y 1962 Contribution à l'étude géochronologique par la méthode au Sr des principaux massifs de granites et de migmatites du massif central français. *Annals de la faculté de sciences de Clermon-Ferrand* 6, 88.
- Vialette Y 1965 Granitisation hercynienne dans le massif central français. *Sciences de la Terre*, 369-382.
- Weatherall A, Proe M F, Craig J, Cameron A D, McKay H M and Midwood A J 2006a Tracing N, K, Mg and Ca released from decomposing biomass to new tree growth. Part I: A model system simulating harvest residue decomposition on conventionally harvested clearfell sites. *biomass Bioenerg* 30, 1053-1059.
- Weatherall A, Proe M F, Craig J, Cameron A D, McKay H M and Midwood A J 2006b Tracing N, K, Mg and Ca released from decomposing biomass to new tree growth. Part II: A model system simulating root decomposition on clearfell sites. *biomass Bioenerg* 30, 1060-1066.
- Weatherall A, Proe M F, Craig J, Cameron A D and Midwood A J 2006c Internal cycling of nitrogen, potassium and magnesium in young Sitka spruce. *Tree Physiol* 26, 673-680.
- Wiegand B A, Chadwick O A, Vitousek P M and Wooden J L 2005 Ca cycling and isotopic fluxes in forested ecosystems in Hawaii. *Geophysical research letters* 32.
- Wombacher F, Eisenhauer A, Heuser A and Weyer S 2009 Separation of Mg, Ca and Fe from geological reference materials for stable isotope ratio analyses by MC-ICP-MS and double-spike TIMS. *J Anal Atom Spectrom* 24, 627-636.

III. Mg and Ca root uptake and vertical transfer in soils assessed by an in situ ecosystem-scale multi-isotopic (^{26}Mg & ^{44}Ca) tracing experiment in a beech stand (Breuil-Chenue, France)

Gregory van der Heijden^{(1)*}, Arnaud Legout⁽¹⁾, Andrew J. Midwood⁽²⁾, Carol-Ann Craig⁽²⁾, Benoît Pollier⁽¹⁾, Jacques Ranger⁽¹⁾, Etienne Dambrine⁽³⁾

Article publié dans PLANT AND SOIL

(1) INRA – UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes forestiers, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France

(2) The James Hutton Institute – Analytical Group, Craigiebuckler, Aberdeen AB15 8QH, Scotland United Kingdom

(3) INRA – UMR 042 CARTELE, Université de Savoie, Centre Interdisciplinaire Scientifique de la Montagne, Belledonne 226, 73376 Le Bourget-du-Lac Cedex

*Corresponding author

Tel : 03 83 39 73 27

Fax : 03 83 39 40 76

gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr

Mg and Ca root uptake and vertical transfer in soils assessed by an in situ ecosystem-scale multi-isotopic (^{26}Mg & ^{44}Ca) tracing experiment in a beech stand (Breuil-Chenue, France)

Gregory van der Heijden · Arnaud Legout ·
Andrew J. Midwood · Carol-Ann Craig · Benoît Pollier ·
Jacques Ranger · Etienne Dambrine

Received: 15 November 2012 / Accepted: 21 November 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract

Background and aims The sustainability of forest ecosystems may be at stake especially in forests on base-poor soils due to reduced nutrient deposition and intensified silvicultural practices. Understanding nutrient availability and cycling is therefore essential to manage forest soil fertility. This study aims to assess in a beech plot Mg and Ca vertical transfer in soil and root uptake using an isotopic tracing experiment.

Methods A simulated rainfall containing a small amount ($960 \text{ gMg}\cdot\text{ha}^{-1}$; $530 \text{ gCa}\cdot\text{ha}^{-1}$) of highly enriched ^{26}Mg and ^{44}Ca was sprayed on the forest floor of a 35-yr-old beech plot. The isotopic composition of fine roots and of the soil exchangeable Mg and

Ca pool was monitored during 1 year. A pool and flux model (IsoMod) was developed to predict the labeling of the soil and vertical transfer of tracers.

Results Tracers (^{44}Ca and ^{26}Mg) were immediately retained in the thin litter layer. During the following year, Mg and to a lesser extent Ca were progressively released. After 1 year, the exchangeable Mg and Ca pools of the upper mineral layer (0–5 cm) were strongly labeled (~660‰, representing ~55 % of the tracer input and ~370‰, ~41 % of the tracer input respectively). A significant proportion (~8 % ^{26}Mg , ~2 % ^{44}Ca) of tracer was leached through the soil, below 10 cm. This amount was much larger than what was predicted using a simple mixing model. The Ca and

Responsible Editor: Ismail Cakmak.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-012-1542-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. van der Heijden (✉) · A. Legout · B. Pollier · J. Ranger
UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers,
INRA de Nancy,
Route d'Amance,
54 280 Champenoux, France
e-mail: gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr

A. Legout
e-mail: legout@nancy.inra.fr

B. Pollier
e-mail: pollier@nancy.inra.fr

J. Ranger
e-mail: ranger@nancy.inra.fr

A. J. Midwood · C.-A. Craig
The James Hutton Institute, Craigiebuckler,
Aberdeen AB15 8QH Scotland, UK

A. J. Midwood
e-mail: Andy.Midwood@hutton.ac.uk

C.-A. Craig
e-mail: Carol-Ann.Craig@hutton.ac.uk

E. Dambrine
INRA-Université de Savoie, UMR CARRTEL,
73376 Le Bourget du Lac, France
e-mail: dambrine@nancy.inra.fr

Mg isotopic composition of fine roots at all depths was close or lower than that of exchangeable Ca and Mg respectively.

Conclusions An in situ ecosystem-scale ^{26}Mg and ^{44}Ca isotopic tracing experiment was successfully carried out. Tracers were at first strongly retained in the litter layer, then progressively transferred to soil horizons below. Nutrient cycling of Mg and Ca were proven to be very different. Mg had a higher mobility in the soil than Ca, and nutrient uptake sources were proven to be different.

Keywords Calcium · Magnesium · Isotope labeling · Root uptake · Leaching · Forest

Introduction

Magnesium and calcium are essential major nutrients in forests on acid soils, both for plants and for soil living organisms. Understanding the fluxes and processes which make these nutrients available is essential to sustainably manage forest soil fertility and forest ecosystem functions. This is particularly true in base-poor forest ecosystem soils which have been depleted of base cations in the past by heavy acid loads and/or forestry practices.

Input–output budgets (Ranger and Turpault 1999) and pool and flux models (Johnson et al. 2000; Liu et al. 1991; Sverdrup and Warfvinge 1988; Wallman et al. 2005; Warfvinge and Sverdrup 1992), have been often used to compute critical acid loads, simulate changes in soil fertility over time and test different silvicultural practices (Bormann and Likens 1967; Brumme et al. 2009; Johnson and Lindberg 1992; Johnson et al. 1993; Johnson and Todd 1998; Legout 2008; Likens et al. 1998; Ranger et al. 2008; Sverdrup et al. 2006; van der Heijden et al. 2011; Warfvinge et al. 1993). Results of these models have been tested using long-term monitoring data sets but many discrepancies between predicted and measured soil nutrient pool change have been reported (Hazlett et al. 2011; Johnson et al. 1997; Johnson and Todd 1998; Likens et al. 1998; McLaughlin et al. 2011; McLaughlin and Phillips 2006; van der Heijden et al. 2011; Yanai et al. 2005). Indeed, some fluxes, such as base cation deposition, and processes such as weathering or the role of organic exchangers in the humus are insufficiently quantified or described. In addition, the availability of Ca and Mg

for plants in acid soils is also insufficiently understood (Jandl et al. 2004; Jonard et al. 2009; Miller and Watmough 2009; van der Heijden et al. 2011).

Natural Ca and Mg isotope variations have been used to provide an insight into sources and processes at the ecosystem scale and in particular tree nutrition but the range of natural variation in both calcium and magnesium isotopes is limited unfortunately. In fact, the isotope ratio of Ca and Mg in bulk deposition and in Ca and Mg-bearing rock minerals often overlap, or do not differ by more than ~2‰ for $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ (Bolou-Bi et al. 2012) and ~4‰ for $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ (Cenki-Tok et al. 2009; Cobert et al. 2011; Farkaš et al. 2011; Hindshaw et al. 2012; Holmden and Bélanger 2010; Wiegand et al. 2005), which often, given the precision of measurements, does not allow for a precise determination of their sources. In addition plants as well as soil exchangers strongly fractionate these isotopes. This complicates this approach. For instance, Bolou-Bi et al. (2012), and Holmden and Bélanger (2010) were able to estimate the Mg and Ca mineral weathering fluxes by measuring isotopic variations within the ecosystem but the accuracy of the estimates was limited by the small range of fractionation observed.

A complementary approach to natural isotope variations is isotopic labeling. Using isotopically enriched material enables labeling of ecosystem compartments and the tracing of fluxes between those compartments by artificially changing the isotopic composition of a given pool and thus increasing isotope variations between pools. Tracing experiments have been widely carried out in many biological systems. An extensive review on the use of stable isotopes as tracers is given by Sturup et al. (2008). Stable isotopes of Ca and Mg have been used to study the different compartments of forest ecosystems: root-mycorrhizal fungus interaction (Bucking et al. 2002; Jentschke et al. 2000, 2001; Kuhn et al. 2000), root uptake (Gottlein et al. 2005; Hogberg et al. 1995; Kuhn et al. 1995, 1998; Midwood et al. 2000; Proe et al. 2000), transport in xylem (Augusto et al. 2011; Kuhn et al. 1997; Metzner et al. 2010) and internal cycling within plants (Becker et al. 2008; Weatherall et al. 2006a, b, c). So far, no in situ ecosystem-scale ^{26}Mg and ^{44}Ca isotopic tracing experiment has been carried out. Ca and Mg enriched materials are indeed very expensive and Mg and Ca ecosystem-pools are often large, thus requiring a significant amount of enriched material to be effectively labeled. On the other hand, the analytical costs using

ICPMs are reduced compared to isotopic measurements at natural abundance levels. An in situ tracing experiment using stable isotopes of Mg and Ca is thus challenging. However, by balancing the amount of enriched isotope tracer used with sensitive and robust analytical techniques, Mg and Ca stable isotopes have the potential to study processes and quantify fluxes between compartments at the ecosystem scale.

In April 2010 an in situ ecosystem-scale multi-isotopic tracing experiment (^{26}Mg , ^{44}Ca , ^{15}N and ^2H) was carried out in a beech plot (Breuil-Chenue, France) to study water and nutrient fluxes in the soil and in the plant, and precisely quantify fluxes between the plant and its environment (root uptake, foliar exchanges). The scope of this study was to present the first/preliminary results of this experiment. The detailed objectives were to i) define if Mg and Ca isotopic tracing techniques could be applied at the ecosystem scale, ii) study the measured tracer fluxes within the topsoil and compare them to the results of a modeling approach and iii) study root ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer uptake dynamics.

Materials & methods

Study site

The experimental site of Breuil-Chenue forest (hereafter named Breuil-Chenue site) is located in the Morvan Mountains, Burgundy, France (latitude $47^{\circ}18'10''$, longitude $4^{\circ}4'44''$). The elevation is 640 m, the annual rainfall 1 180 mm, the mean annual potential evapotranspiration (PET) 750 mm and the mean annual temperature 9°C (computed over the period 2006–2010). The soil is an Alcristol (Alumic Cambisol; WRB FAO) displaying micro-podzolisation features in the upper mineral horizon. The humus is a dysmoder with three layers (L, F and H) (Ranger et al. 2004). The soil parent material is granite, dated 296 ± 5 Ma (Viallette 1962, 1965), containing 23.5 % quartz, 44 % K-feldspar, 28.5 % plagioclase, 1.6 % biotite and 1.6 % muscovite (Mareschal 2008). Total element analysis of the parent

material is presented in (Table 1). In 1975, part of the native forest (coppice with standards) located on a homogeneous soil type was clear-cut and plots covering $1,000\text{ m}^2$ were planted with different species. The present study focused on the beech plot (*Fagus sylvatica* L.). A description of soil properties is given in Table 2.

Monitoring equipment

Over the 2002–2009 period, throughfall, soil solutions and litterfall were monitored in the beech plot at the Breuil-Chenue site. Litterfall was collected every 3 months from 2001 to 2007 with 5 collectors covering in total 2.5 m^2 , samples were dried and weighed, then milled and digested with 50 % nitric acid. Throughfall was collected with four 2-m-long PEHD gutters covering in total 1.55 m^2 .

A subplot of the beech plot (hereafter named tracing plot) was equipped in 2009 to carry out a tracing experiment detailed below. The plot covered 80 m^2 and was equipped for solution monitoring. Soil solutions were collected with hand-made PEHD zero-tension lysimeters (ZTL) placed between the litter layer and the soil surface (hereafter referred to as 0 cm depth) and at 10 cm depth (3 replicates) and with ceramic tension-cup lysimeters (TCL; Oikos Umweltanalytik GBR, Ceramic P80, porosity $45\text{ }\mu\text{m}$, alumina-silica), with an applied pressure of 0.6 bars, at 15, 30 and 60 cm depth (4 replicates/depth).

Throughfall and soil solutions were collected every 28 days. Ca and Mg concentrations in throughfall, soil solutions and litterfall digests were measured by ICP-AES (Jobin-Yvon 180 ULTRACE).

Tracing experiment and elemental sample analysis

A multi-isotopic tracing experiment was carried out in April 2010. The tracing solution (350 ppmMg; 200 ppm Ca) was made up by dissolving enriched ^{26}MgO (99.25 atom% ^{26}Mg) and $^{44}\text{CaCO}_3$ (96.45atom% ^{44}Ca). Twenty liters of the tracing solution were sprayed on the ground of the tracing plot representing a 0.25 mm rainfall event. 16 mm of deionised water were sprayed on the tracing

Table 1 Total element analysis of the granite bedrock at the Breuil-Chenue site (Mareschal 2008)

SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅
76.07	13.55	1.26	0.05	0.13	0.31	3.51	4.46	0.07	0.08

Table 2 Breuil-Cheneu experimental site soil description. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2 mm diameter (mass of soil particles smaller than 2 mm/total volume of soil). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC)

Horizon	Depth cm	Bulk density Ø <2 mm g.kg ⁻¹	C	g.kg ⁻¹	C/N	Soil texture			Soil cationic exchange capacity						
						Sand %	Silt %	Clay %	ECEC cmolc.kg ⁻¹	BS %	Mg cmolc.kg ⁻¹	Ca cmolc.kg ⁻¹	K cmolc.kg ⁻¹	Al cmolc.kg ⁻¹	H cmolc.kg ⁻¹
AI/E	0-5	0.50	72.6	18.0	57.6	21.8	20.6	8.66	19.44	0.23	0.54	0.37	6.30	0.83	
AI-AI/Bp	5-10	0.64	46.1	18.1	60.2	21.5	18.4	7.23	10.88	0.13	0.15	0.22	6.05	0.42	
Sal 1	10-15	0.67	34.2	18.1	58.0	23.6	18.4	5.43	7.88	0.08	0.07	0.14	4.85	0.18	
Sal 2	15-25	0.89	23.3	17.9	60.0	24.1	16.0	4.08	5.75	0.04	0.02	0.10	3.79	0.12	
Sal 2	25-40	0.90	14.0	17.1	57.8	24.7	17.5	3.13	7.38	0.03	0.02	0.08	2.73	0.09	
Sal 3	40-55	1.08			55.7	25.8	18.5	3.11	8.06	0.02	0.01	0.09	2.62	0.08	
II Sal 4	55-70	1.05			57.3	25.3	17.5	3.32	8.06	0.03	0.02	0.09	2.80	0.10	

plot over a period of 8 h so as to simulate a natural rainfall event. During the first year after the tracing experiment, soil and soil solutions were monitored as described below. At a 28 day time-step, 8 soil profiles were sampled with a cylindrical corer. Fine roots and the organic layer were separated from soil samples and dried at 65 °C. Roots were washed with a 1 M ammonium acetate solution (extraction of adsorbed Mg and Ca on roots), rinsed with deionised water, dried at 65 °C, milled and roots and the organic layer samples were digested with 50 % nitric acid. Soil CEC (cationic exchange capacity) extractions were carried out using ammonium acetate (1 M) as extractant. Soil solutions were also collected every 28 days and were stored in 60 mL polypropylene bottles at 4 °C. Calcium and magnesium concentrations in solutions, soil CEC extractions and fine root digests were measured by ICP-AES (Jobin-Yvon 180 Ultrac).

Measuring ²⁶Mg/²⁴Mg and ⁴⁴Ca/⁴⁰Ca with ICP-MS

Measured isotopic compositions of samples are expressed with the absolute value of the isotope ratio (²⁶Mg/²⁴Mg and ⁴⁴Ca/⁴⁰Ca) or in permil deviations relative to the Mg and Ca reference ratios (DSM3 and NIST SRM 915a respectively):

$$\delta^{26/24}Mg = \left\{ \left(\frac{{}^{26}Mg/{}^{24}Mg}{\text{sample}} / \left(\frac{{}^{26}Mg/{}^{24}Mg}{\text{DSM3}} \right) - 1 \right\} \times 1000$$

$$\delta^{44/40}Ca = \left\{ \left(\frac{{}^{44}Ca/{}^{40}Ca}{\text{sample}} / \left(\frac{{}^{44}Ca/{}^{40}Ca}{\text{NIST915a}} \right) - 1 \right\} \times 1000$$

²⁶Mg/²⁴Mg and ⁴⁴Ca/⁴⁰Ca isotope ratios were measured with ICP-MS: Bruker 820MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Ammonium acetate at high concentrations is a source of spectral interferences on ²⁴Mg (¹²C¹²C) and ²⁶Mg (¹²C¹⁴N). For this reason, ammonium acetate from soil CEC extractions was digested using peroxide: 10 mL of the initial sample was evaporated in polypropylene bottles; 2.5 mL peroxide (30 % volumetric concentration) was added. The bottles were then capped and left 3 days at 65 °C. The remaining peroxide was then evaporated and 10 mL of Millipore water was added. Because detector response

was not linear with sample concentration (Online Resource 1), sample concentration was adjusted (dilution or evaporation) to 100 ppbMg or Ca. Prior to isotope ratio analysis, elemental Mg and Ca concentrations were measured by ICP-AES for all samples. Total mass bias in the mass spectrometer was corrected for with the standard bracketing technique. For $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$, detector response was linear with sample ^{26}Mg enrichment for $\delta^{26}\text{Mg}$ values below 20 000‰ (Online Resource 2). Mass bias was thus corrected for with the NIST SRM 980 standard (analyzed every 10 samples). For $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, because response was not linear with sample ^{44}Ca enrichment (Online Resource 2), mass bias correction equations required two standards: NIST SRM 915b and a ^{44}Ca in-house enriched standard (analyzed every 10 samples).

Isotope ratio analysis methods with Bruker 820MS were validated by measuring $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ in 30 samples with an Agilent 7500CE series (Agilent Technologies, Cheshire, UK) instrument (Online Resource 3). These 30 samples covered a wide range of isotope enrichments and represented the three types of samples collected from the tracing plot: soil solutions, soil CEC extractions (ammonium acetate; 1 M) and vegetation digests. $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ isotope ratio analysis method with Bruker 820MS was also validated by measuring $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ in the 30 samples with a TIMS system VG Sector 54 Instrument (VG Instruments, Cheshire UK) (Online Resource 4). Bruker 820MS measurement precision for $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ were 0.20 % and 0.32 % respectively and accuracy was 0.07 % and -0.27 %.

Given ICP-MS precision and accuracy when measuring $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ and Mg and Ca natural isotope variations (Bolou-Bi et al. 2009, 2010, 2012; Brenot et al. 2008; Cenki-Tok et al. 2009; de Villiers et al. 2005; Farkaš et al. 2011; Hindshaw et al. 2012; Holmden and Bélanger 2010; Page et al. 2008; Pogge von Strandmann et al. 2008; Russell et al. 1978; Wiegand et al. 2005), the detection limit (isotope enrichment above which measured enrichment is with certainty due to the presence of ^{26}Mg or ^{44}Ca tracers) was set at 10‰.

IsoMod—modeling isotopic dilution of initial spike with time

We developed a simple pool and flux isotope mixing model (hereafter named IsoMod) based on input–

output and pool and flux models (Ranger and Turpault 1999) to predict isotope dilution of the initial ^{26}Mg and ^{44}Ca spike and vertical tracer transfer in the soil.

Input and output fluxes

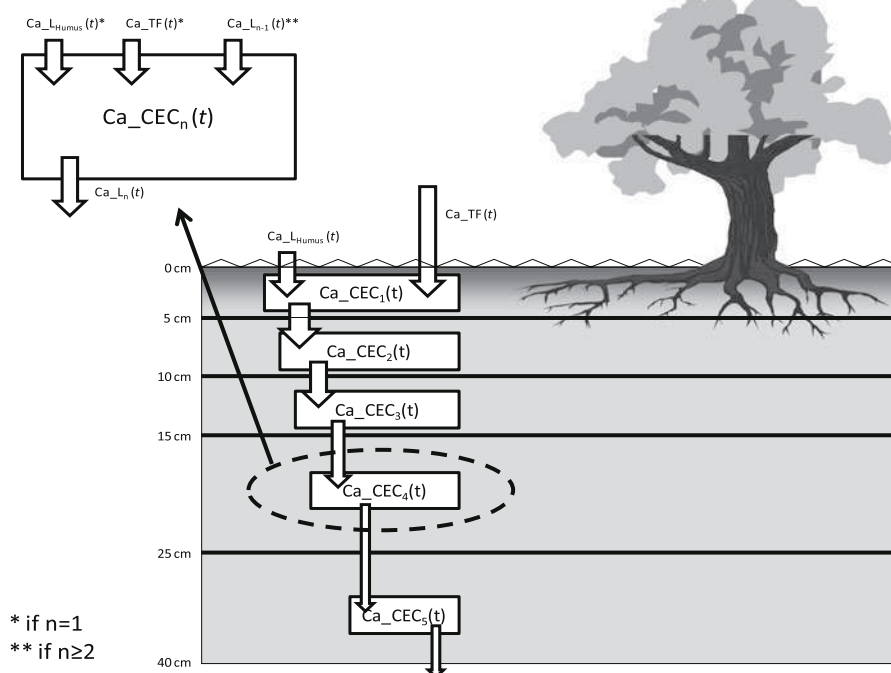
Mean monthly fluxes were computed for the beech plot over the 2002–2009 period. The Mg and Ca throughfall flux was estimated by multiplying the measured volume of water ($\text{L}\cdot\text{m}^{-2}$) by the measured concentrations. The nutrient leaching flux at 15, 30 and 60 cm depth was estimated by multiplying measured tension-cup lysimeters concentrations with the modelled water drainage flux (data not shown). Finally, we assume that the litter pool does not change over the simulation period (1 year, 2010–2011). The Mg and Ca litter decomposition flux was thus estimated with the Mg and Ca litterfall flux. The soil exchangeable Mg and Ca pools were computed from Table 2.

Model description

We assume that given the isotopic labeling of the soil exchangeable pool, nutrient uptake by roots does not induce a significant isotopic fractionation, that nutrient leaching from soil layer n has the same isotopic composition as Mg and Ca exchangeable pools in soil layer n and finally that Mg and Ca exchangeable pool sizes do not change over the simulation period (1 year) and are not increased by the artificial ^{26}Mg and ^{44}Ca spike (0.96 and 0.53 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ respectively). To simplify the model, given the base poor parent material (Table 1) and the short time scale considered, we also assume that the Mg and Ca weathering flux does not provide a significant amount of Mg and Ca to the exchangeable pool. Thus this flux was not taken into account in IsoMod. Finally, we assume that no organic matter mineralization occurs in the different soil layers (i.e no Mg and Ca input from soil organic matter decay).

The soil profile was divided into different soil layers: 0–5 cm, 5–10 cm, 10–15 cm, 15–25 cm, 25–40 cm, 40–55 cm and 55–70 cm. A schematic description of the model is given in Fig. 1. The ^{26}Mg and ^{44}Ca spike was added as a pulse to the topsoil layer (0–5 cm) inputs during the month of April. At each time step (month), isotopic composition change in each soil layer is simulated as follows (only the Ca

Fig. 1 A schematic description of IsoMod, a model to predict the labeling of the soil layers and isotopic dilution of the initial spike with time. A description of variable names is given in Table 3



equations are presented here (Mg equations are similar) and a summary of all Mg and Ca variables used in the model are presented in Table 3).

Ca inputs to layer n are mixed with the Ca exchangeable pool of soil layer n . The isotopic composition of the Ca exchangeable pool of soil layer n at time step t is then

computed from the mixing of inputs to layer n at time step t and the Ca exchangeable pool of soil layer n at time step $t-1$ (1). Inputs to the topsoil layer are the throughfall and litter decomposition fluxes and inputs to all other layers are nutrient leaching from the layer directly above.

$${}^{44}\text{Ca_CEC}_n(t) = \frac{{}^{44}\text{Ca_CEC}_n(t-1) \times \text{Ca_CEC}_n(t-1) + {}^{44}\text{Ca_Input}_n(t) \times \text{Ca_Input}_n(t)}{\text{Ca_CEC}_n(t-1) + \text{Ca_Input}_n(t)}$$

Table 3 Summary of variables used in the IsoMod model to predict isotope dilution and vertical transfer of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the soil profile. The isotopic composition column summarizes the model assumptions and isotopic composition is expressed in atom%

Element	Pool or flux	Symbol	Isotopic composition (atom%)
Mg	Soil CEC Mg in soil layer n	$\text{Mg_CEC}_n(t)$	$\%^{26}\text{Mg_CEC}_n(t)$
	Mg leaching flux from soil layer n	$\text{Mg_L}_n(t)$	$\%^{26}\text{Mg_L}_n(t) = \%^{44}\text{Mg_CEC}_n(t)$
	Mg leaching flux from the humus	$\text{Mg_L_Humus}(t)$	$\%^{26}\text{Mg}_{\text{nat}}$
	Mg throughfall flux	$\text{Mg_TF}(t)$	$\%^{26}\text{Mg}_{\text{nat}}$
Ca	Soil CEC Ca in soil layer n	$\text{Ca_CEC}_n(t)$	$\%^{44}\text{Ca_CEC}_n(t)$
	Ca leaching flux from soil layer n	$\text{Ca_L}_n(t)$	$\%^{44}\text{Ca_L}_n(t) = \%^{44}\text{Ca_CEC}_n(t)$
	Ca leaching flux from the humus	$\text{Ca_L_Humus}(t)$	$\%^{44}\text{Ca}_{\text{nat}}$
	Ca throughfall flux	$\text{Ca_TF}(t)$	$\%^{44}\text{Ca}_{\text{nat}}$

Where $\%^{44}\text{Ca}_{\text{CEC}_n(t)}$ is the isotopic composition of soil exchangeable Ca in soil layer n at time step t (expressed in atom‰), $\text{Ca}_{\text{CEC}_n(t)}$ the soil exchangeable total Ca in soil layer n at time step t (expressed in mol/ha), $\%^{44}\text{Ca}_{\text{Input}_n(t)}$ the isotopic composition of the Ca input flux to soil layer n at time step t (expressed in mol/ha), $\text{Ca}_{\text{Input}_n(t)}$ the total Ca input flux to soil layer n at time step t (expressed in mol/ha). The isotopic composition throughfall and litter decomposition was assumed to be close to natural abundance and was thus set at 0‰ for both Mg and Ca.

Results

^{26}Mg and ^{44}Ca labeling of the pool of exchangeable cations in the organic and soil layers

A simple pool and flux model (IsoMod) was used to simulate the isotopic dilution and the vertical transfer of the artificial ^{26}Mg and ^{44}Ca spike, in order to determine the efficiency of the spike: what order of magnitude of isotope enrichment could be expected and how long would the tracers remain detectable? After 1 year, IsoMod predicted high ^{26}Mg and ^{44}Ca enrichments in the soil Mg and Ca exchangeable pools (Fig. 2). Both $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ were much higher in the topsoil (0–5 cm), $\sim 850\%$ and $\sim 550\%$ respectively. Only a small amount of ^{26}Mg and ^{44}Ca was rapidly transferred to deeper soil layers: $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ were found to be $\sim 200\%$ and $\sim 125\%$ representing 13.3 % and 3.7 % of the initial applied tracer, in the 5–10 cm soil layer, $\sim 40\%$ and $\sim 25\%$ in the 10–15 cm soil layer representing 4.7 % and 1.3 %. Negligible amounts of tracer were transferred below 15 cm depth: $\sim 7.5\%$ and $\sim 5.1\%$ in the 15–25 cm soil layer.

Soil CEC pools were efficiently labeled by the artificial ^{26}Mg and ^{44}Ca spike (Fig. 2). $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ were the highest in the topsoil (0–5 cm): $\sim 660\%$ and $\sim 370\%$ respectively. $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ decreased rapidly with depth but significant amounts of tracer were found in the 25–40 cm soil layer ($\sim 80\%$ and $\sim 45\%$). Isotopic composition of soil solution collected with tension-cup lysimeters at 15, 30 and 60 cm depth was very similar to the isotopic composition of the Mg and Ca CEC pools at the same depths. However, solutions collected with zero-tension lysimeters at 10 cm depth ($\sim 320\%$ and $\sim 228\%$ for $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ respectively) were more enriched than the exchangeable cation pool

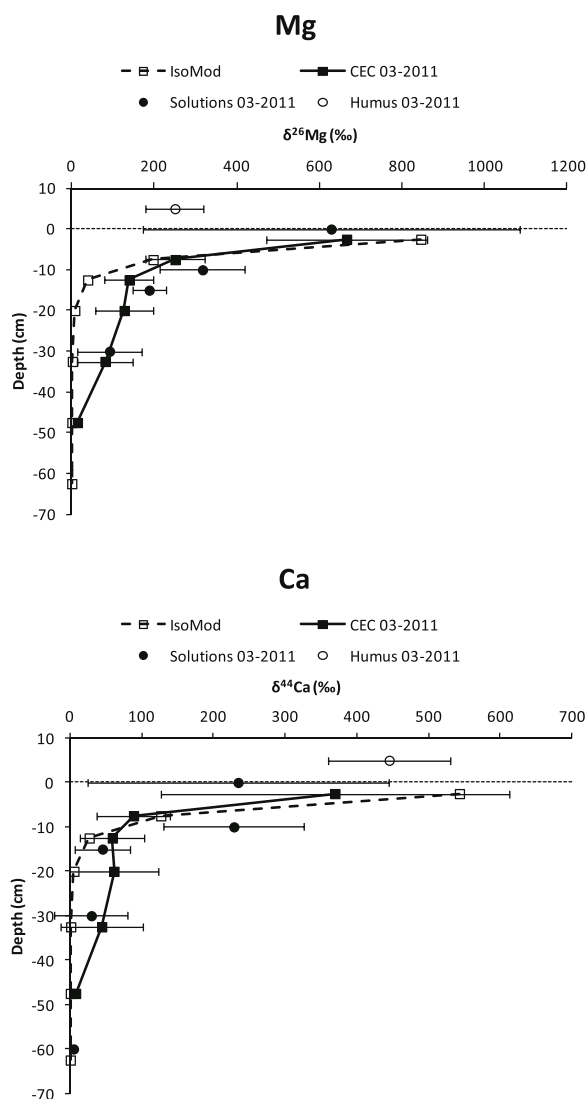


Fig. 2 Modeled and measured isotopic composition ($\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$; ‰) of the soil CEC Mg and Ca pools 1 year after the tracing experiment (March 2011). Modeled isotopic compositions are represented with *empty squares* and a *dotted line*, measured isotopic composition of the soil CEC Mg and Ca pools with *full squares* and a *continuous line*. Isotopic composition in soil solutions sampled at the same date as the soil samples (zero-tension lysimeter at 0 and 10 cm depth, and tension-cup lysimeter at 15, 30 and 60 cm depth) are represented with *full circles*. *Error bars* represent standard deviations computed from soil sample and soil solution replicates

($\sim 140\%$ and $\sim 60\%$). Solutions collected with zero-tension lysimeters at 0 cm depth were also highly enriched ($\sim 630\%$ and $\sim 235\%$).

The isotopic composition of the bulk organic layer was enriched in ^{26}Mg and ^{44}Ca 1 year after the tracing

experiment: $\delta^{26}\text{Mg}$ was $\sim 250\text{‰}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ was $\sim 450\text{‰}$. $\delta^{26}\text{Mg}$ in the organic layer was lower than in the topsoil ($\sim 660\text{‰}$). However, $\delta^{44}\text{Ca}$ in the organic layer was slightly higher than in the topsoil ($\sim 370\text{‰}$).

The predicted isotopic compositions of the Mg and Ca exchangeable pools by the IsoMod model were different from measured values. IsoMod predicted higher enrichments in the topsoil (0–5 cm) for both Mg and Ca. Predicted and measured values were fairly close for the 5–10 cm layer. However, predicted values were much lower than measured isotopic compositions for all depths below 10 cm. The model predicted a very small transfer of tracers to soil layers deeper than 15 cm while significant amounts of tracer were measured in the 25–40 cm soil layer.

Mg and Ca root uptake

$\delta^{26}\text{Mg}$ were generally lower in bulk fine roots than in the Mg exchangeable pool or in the soil solutions (Fig. 3). The difference was smaller for the least enriched samples: the isotopic composition of roots, CEC and soil solutions were relatively close. The isotopic composition of bulk fine root was however strongly related to the Mg exchangeable pool ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.449$). $\delta^{44}\text{Ca}$ values in bulk fine roots were strongly correlated to the Ca exchangeable pool $\delta^{44}\text{Ca}$ ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.585$) and the isotopic signature of all three pools (roots, Ca exchangeable pool and soil solutions) was very similar.

Discussion

Isotopic labeling and natural isotope variations: two complementary approaches

Isotopic labeling techniques have many advantages. By artificially inducing great isotopic composition differences between ecosystem compartments, smaller fluxes may be evidenced and precisely computed as demonstrated theoretically below for ^{26}Mg labeling.

For a ^{26}Mg labeled pool (*Pool A*, $\delta^{26}\text{Mg} \sim 2500\text{‰}$) mixing with a natural abundance Mg flux (*Flux B*, $\delta^{26}\text{Mg} \sim 0\text{‰}$), with an analytical precision with ICP-MS of $\pm 5\text{‰}$, *Flux B* would be evidenced if *Flux B* was greater than 0.2 % of *Pool A* size. If *Pool A* was not labeled with ^{26}Mg , its isotopic composition would be close to that of *Flux B* (the difference would be at the

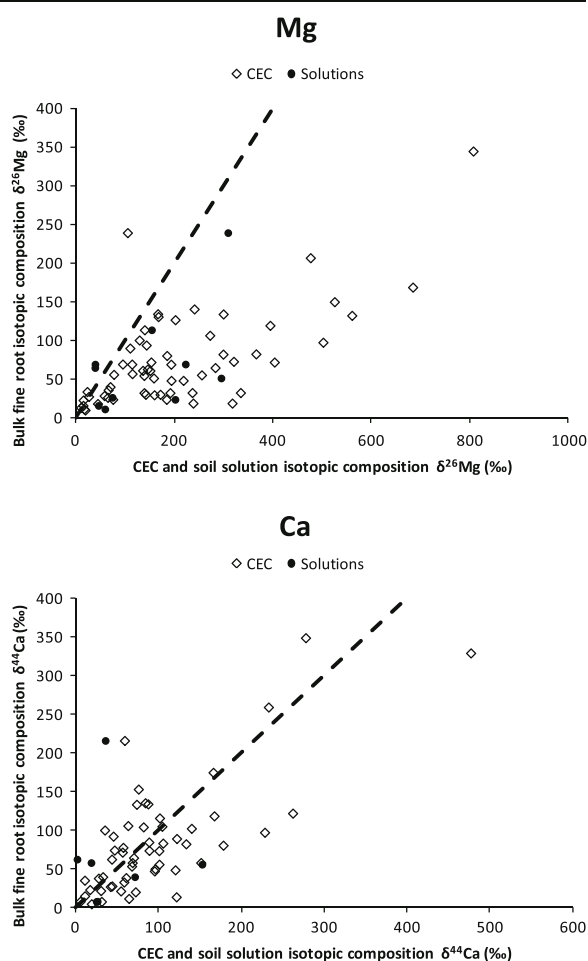


Fig. 3 Bulk fine root isotopic composition ($\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$; ‰) plotted against soil CEC Mg and Ca pools isotopic composition and soil solution isotopic composition over the first year after the tracing experiment and over a range of depths (from 0 to 45 cm). The dotted line represents 1:1 line

most 1.5‰) (Bolou Bi 2009). In such a case, even with high precision ($\pm 0.05\text{‰}$) $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ analysis (Tipper et al. 2008), *Flux B* would only be evidenced if it was greater than 3.5 % of *Pool A* size.

Isotopic labeling techniques enable to label specific ecosystem compartments (branches, leaves, humus, soil exchangeable cation pools...) and specifically study fluxes in and out of those compartments (foliar exchanges, litter decomposition, uptake and internal translocation, weathering) and thus better understand and quantify the importance of each of these processes in nutrient cycling. As said previously, another advantage of isotopic labeling is low analysis costs (short analysis times and little sample preparation). More

samples can thus be analyzed; spatial and temporal variability can be studied.

Natural isotope variations and isotopic labeling techniques are two different but complementary approaches for studying forest ecosystems. Indeed, observed natural isotope variations integrate processes over long periods of time and help apprehend the key processes. Isotopic labeling techniques may then be used to confirm or reject hypotheses. Finally, given the cost of ^{26}Mg and ^{44}Ca labeled material, large scale tracing experiments, such as the catchment-scale, or tracing experiments in ecosystems where Mg and Ca are highly abundant, is unimaginable.

In our case, the Mg and Ca exchangeable pools were efficiently labeled by the artificial ^{26}Mg and ^{44}Ca spike (Fig. 2): i) enrichment of the samples was higher than the effective isotope ratio detection limit as defined by the accuracy of the ICP-MS methodology and ii) the isotopic signature of the CEC pool was significantly different from natural abundance values. The amount of artificial $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ was thus sufficient for the tracing experiment.

A two velocity vertical transfer of cations in the soil profile

Mg and Ca tracer retention and release in the humus layer

The model used to predict the isotopic dilution and vertical transfer of ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers was able to predict similar enrichments to those actually measured in the exchangeable cation pool in the first 10 cm of the soil profile, 1 year after the tracing experiment. However, IsoMod predicted higher enrichments in the topsoil (0–5 cm). Such a discrepancy may be explained by an underestimation of natural abundance inputs to the topsoil (weathering flux, mineralization of soil organic matter Mg and Ca flux, throughfall flux), and/or a retention of the artificial ^{26}Mg and ^{44}Ca spike in the organic layer. Given soil mineralogy and climatic conditions, it is unlikely that an underestimation of the weathering flux or mineralization of soil organic matter flux could explain such a discrepancy. Such an underestimation of the throughfall flux is also unlikely. The results from the tracing experiment suggest a high retention of Mg and Ca in the organic layer. Indeed, 1 year after the tracing experiment, isotope ratios measured in the bulk organic layer were still very high. Cations are known to have a

high affinity for the organic matter in the humus. Ca and Mg may be retained on the cation exchange sites of organic materials (Lax et al. 1986) or in more stable forms such as oxalate crystals (Cromack et al. 1979; Gadd 2007; Tait et al. 1999). The retention of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the organic layer was nonetheless surprising given the fast turnover rates of litterfall (humus type: mesomull) and given the thin organic layer: the L layer was only 0.5 to 1 cm thick and the F layer was very thin and discontinuous (Moukoui 2006).

In consequence, the isotopic composition of ZTL collected solutions at 0 cm depth were highly enriched (Fig. 2) meaning that ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers are still released from the humus layer even after 1 year. Farkaš et al. (2011) using natural Ca isotope variations and radiogenic ^{40}Ca signals also came to the conclusion that the main Ca source for forest growth was the organic layer. Our results show the importance of the organic layer in the retention and progressive release of Mg and Ca inputs to forest ecosystems. In most pool and flux models these retention processes are currently not taken into account. The organic layer is considered as a nutrient pool which releases nutrients from litterfall. Although the form of retention as discussed above is yet to be determined, such processes need to be integrated into pool and flux models.

Mg and Ca tracer rapid transfer

IsoMod predicted lower enrichments in the soil layers below 10 cm depth for both Mg and Ca. The only possible explanation for such a discrepancy is an underestimation of the vertical transfer of ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers. Preferential water flow has been evidenced in the tracing plot (data not shown) and high enrichments have been measured 1 year after the tracing experiment in ZTL collectors at 10 cm depth (~320‰ and ~228‰ for $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ respectively). Furthermore, ZTL mainly collect water flowing rapidly through the rapid-mobile porosity (Legout et al. 2009). It is thus likely that a preferential flow occurs, transferring Mg and Ca rapidly through the soil profile.

Mg and Ca transferred vertically in the soil at two different velocities. Mg and Ca was retained and progressively released from the humus layer slowing considerably down the vertical transfer to the topsoil layer. At the same time, Mg and Ca were rapidly transferred from the soil surface to deeper soil layers (25–40 cm). These results show the complexity of Mg

and Ca dynamics in the soil and modeling such dynamics would require a more complex model taking into account water flow velocity (matrix and preferential flow) and cation affinity for organic or mineral exchange sites.

Mg and Ca root uptake

The isotopic tracing experiment shows that the main Mg and Ca nutrient source for roots is the soil solution and the exchangeable cation pool with which the solution is in equilibrium. The main piece of evidence is the significant correlation between the isotopic signature of bulk fine roots and the exchangeable cation pools (Fig. 3). In addition, the ^{44}Ca isotopic signature of bulk fine roots was very close to that of the Ca exchangeable pool. Ca in roots is in equilibrium with the Ca in the root environment. Kuhn et al. (2000), in a root isotopic labeling experiment, showed that root Mg and Ca was at equilibrium with the tracer solution within minutes. However, the ^{26}Mg isotopic signature was lower in bulk fine roots than in the exchangeable cation pool and soil solutions (Fig. 3).

A first hypothesis to explain such a discrepancy could be a fractionation of isotopes during the uptake process. Bolou-Bi et al. (2010) found evidence of Mg isotope fractionation during root uptake. However, root uptake favored the heavy isotope: roots resulted enriched in ^{26}Mg compared to the nutritive solution. In our case, roots were enriched in the lighter isotope compared to the exchangeable cation pool. Furthermore, it is unlikely that a fractionation process alone would explain such a difference between root and exchangeable cation pool $\delta^{26}\text{Mg}$.

A different nutrient source with a different isotopic signature could explain why roots are less enriched in ^{26}Mg than the exchangeable cation pool. This source could be: mineral weathering or preferential seepage of stemflow. Weathering processes have been shown to be more important in the rhizosphere (Turpault et al. 2009) and numerous studies have shown that selective and biologically-mediated (mycorrhizal fungi) weathering of Mg-rich minerals (biotite for example) is an important process for Mg tree-nutrition (Arocena et al. 2011; Calvaruso et al. 2006). Mg in stemflow may transfer rapidly along root paths (Martinez-Meza and Whitford 1996) thus directly available for root uptake.

Finally, isotopic dilution of root ^{26}Mg may occur due to internal cycling of Mg through the phloem sap

flow (Marschner 1995; Proe et al. 2000). Phloem sap flow would not be labeled and would thus decrease the ^{26}Mg root enrichment. Gottlein et al. (2005) also found in a root uptake tracing experiment lower Mg tracer recovery in roots compared to Ca. Mg was also found to diffuse less than Ca from xylem to surrounding tissues (Metzner et al. 2010). Mg may transfer more rapidly to the aboveground biomass compartment without homogeneously labeling the root biomass compartment. These hypothesis are also supported by the lower mobility of Ca than Mg in the phloem due to physiological constraints (Marschner 1995) and the higher affinity of Ca for cation exchange sites such as in the xylem cell wall (Augusto et al. 2011).

The differences observed between both nutrients may be the result of different processes governing Mg and Ca cycling in the forest ecosystem. Ca is a more abundant nutrient in trees and is less mobile than Mg. Furthermore, Mg may be found in primary and secondary minerals such as biotite (Mareschal 2008). Mineral weathering may be more important in Mg cycling. In old soils in which primary minerals bearing Ca have disappeared and no secondary minerals containing Ca are found, it is very unlikely that mineral weathering plays an important role in Ca cycling. The key process is more likely to be recycling of Ca in the humus layer.

Understanding Mg and Ca cycling is of major importance to sustainably manage forest soil fertility. Forest ecosystems where nutrients have been depleted from the soil by past heavy acid loads are the most threatened, especially with increasing forest policies encouraging biomass harvest to produce bio-energy to reduce carbon dioxide emissions. Using stable isotopes to trace Mg and Ca is a very powerful tool and the long-term monitoring of the tracing experiment plot will enable the quantification of fluxes between ecosystem compartments and thus determine the key processes in Mg and Ca cycling in forest ecosystems on base-poor acidic soils.

Acknowledgments We would like to thank the following institutions: Région Lorraine and the European Fund for Regional Development (FEDER), GIPECOFOR and the Zone Atelier Moselle (ZAM) for funding the present study. We would also like to thank l'Office National des Forêts, Dominique Gelhaye, Pascal Bonnaud and Serge Didier for their contribution to the Breuil-Chene site management, sampling and analysis over the years.

We are also grateful to Dr Andrew Weatherall for providing some of the isotopically enriched biomass material used in this study. We also acknowledge the Scottish Government's Research and Science Division for supporting the work conducted at The James Hutton Institute.

References

- Arocena JM, Velde B, Robertson SJ (2011) Weathering of biotite in the presence of arbuscular mycorrhizae in selected agricultural crops. *Appl Clay Sci*
- Augusto L, Zeller B, Midwood AJ, Swanston C, Dambrine E, Schneider A, Bosc A (2011) Two-year dynamics of foliage labelling in 8-year-old *Pinus pinaster* trees with (15)N, (26)Mg and (42)Ca-simulation of Ca transport in xylem using an upscaling approach. *Ann For Sci* 68:169–178
- Becker JS, Fullner K, Seeling UD, Fornalczyk G, Kuhn AJ (2008) Measuring magnesium, calcium and potassium isotope ratios using ICP-QMS with an octopole collision cell in tracer studies of nutrient uptake and translocation in plants. *Anal Bioanal Chem* 390:571–578
- Bolou Bi E (2009) Etude du rôle de la végétation dans le cycle biogéochimique du magnésium: approche isotopique. Université Henri Poincaré, Nancy, p 286
- Bolou-Bi EB, Vigier N, Brenot A, Poszwa A (2009) Magnesium isotope compositions of natural reference materials. *Geostand Geoanal Res* 33:95–109
- Bolou-Bi EB, Poszwa A, Leyval C, Vigier N (2010) Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geochim Cosmochim Acta* 74:2523–2537
- Bolou-Bi EB, Vigier N, Poszwa A, Boudot JP, Dambrine E (2012) Effects of biogeochemical processes on magnesium isotope variations in a forested catchment in the Vosges Mountains (France). *Geochim Cosmochim Acta* 87:341–355
- Bormann FH, Likens GE (1967) Nutrient cycling. *Science* 155:424–429
- Brenot A, Cloquet C, Vigier N, Carignan J, France-Lanord C (2008) Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochim Cosmochim Acta* 72:5070–5089
- Brumme R, Meesenburg H, Bredemeier M, Jacobsen C, Schönfelder E, Meiwes KJ, Eichhorn J (2009) Changes in soil solution chemistry, seepage losses, and input–output budgets at three beech forests in response to atmospheric deposition. In: Brumme R, Khanna PK (eds) *Ecological studies 208—functioning and management of European Beech Ecosystems*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 303–336
- Bucking H, Kuhn AJ, Schroder WH, Heyser W (2002) The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? *J Exp Bot* 53:1659–1669
- Calvaruso C, Turpault M-P, Frey-Klett P (2006) Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Appl Environ Microbiol* 72:1258–1266
- Cenki-Tok B, Chabaux F, Lemarchand D, Schmitt A-D, Pierret M-C, Viville D, Bagard M-L, Stille P (2009) The impact of water–rock interaction and vegetation on calcium isotope fractionation in soil- and stream waters of a small, forested catchment (the Strengbach case). *Geochim Cosmochim Acta* 73:2215–2228
- Cobert F, Schmitt AD, Bourgeade P, Labolle F, Badot PM, Chabaux F, Stille P (2011) Experimental identification of Ca isotopic fractionations in higher plants. *Geochim Cosmochim Acta* 75:5467–5482
- Cromack K, Sollins P, Graustein WC, Speidel K, Todd AW, Spycher G, Li C, Todd RL (1979) Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biol Biochem* 11:463–468
- de Villiers S, Dickson JAD, Ellam RM (2005) The composition of the continental river weathering flux deduced from seawater Mg isotopes. *Chem Geol* 216:133–142
- Farkaš J, Déjeant A, Novák M, Jacobsen SB (2011) Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca²⁺ in a base-poor forest: a new concept of combining stable ($\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$) and radiogenic (ϵCa) signals. *Geochim Cosmochim Acta* 75:7031–7046
- Gadd GM (2007) *Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation*. *Mycol Res* 111:3–49
- Gottlein A, Heim A, Kuhn AJ, Schroder WH (2005) In-situ application of stable isotope tracers in the rhizosphere of an oak seedling. *Eur J For Res* 124:83–86
- Hazlett PW, Curry JM, Weldon TP (2011) Assessing decadal change in mineral soil cation chemistry at the Turkey Lakes Watershed. *Soil Sci Soc Am J* 75:287–305
- Hindshaw R, Reynolds B, Wiederhold J, Kiczka M, Kretzschmar R, Bourdon B (2012) Calcium isotope fractionation in alpine plants. *Biogeochemistry*:1–16
- Hogberg P, Jensen P, Nasholm T, Ohlsson H (1995) Uptake of ²⁴Mg by excised pine roots—a preliminary study. *Plant Soil* 172:323–326
- Holmden C, Bélanger N (2010) Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochim Cosmochim Acta* 74:995–1015
- Jandl R, Alewell C, Prietzel J (2004) Calcium loss in Central European forest soils. *Soil Sci Soc Am J* 68:588–595
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schroder WH, Becker JS, Godbold DL (2000) The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant Soil* 220:243–246
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schröder WH, Godbold DL (2001) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* 149:327–337
- Johnson DW, Lindberg SE (1992) *Atmospheric deposition and forest nutrient cycling*. Springer, New-York, p 707
- Johnson DW, Todd DE (1998) Harvesting effects on long-term changes in nutrient pools of mixed oak forest. *Soil Sci Soc Am J* 62:1725–1735
- Johnson DW, Swank WT, Vose JM (1993) Simulated effects of atmospheric sulfur deposition on nutrient cycling in a mixed deciduous forest. *Biogeochemistry* 23:169–196
- Johnson CE, Romanowicz RB, Siccama TG (1997) Conservation of exchangeable cations after clear-cutting of a northern hardwood forest. *Can J For Res—Rev Can Rech For* 27:859–868
- Johnson DW, Sogn T, Kvindesland S (2000) The nutrient cycling model: lessons learned. *Forest Ecol Manag* 138:91–106
- Jonard M, André F, Dambrine E, Ponette Q, Ulrich E (2009) Temporal trends in the foliar nutritional status of the French, Walloon and Luxembourg broad-leaved plots of forest monitoring. *Ann For Sci* 66:412–421
- Kuhn AJ, Bauch J, Schroder WH (1995) Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant Soil* 168–169:135–150

- Kuhn AJ, Schroder WH, Bauch J (1997) On the distribution and transport of mineral elements in xylem, cambium and phloem of spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Holzforschung* 51:487–496
- Kuhn AJ, Schroder WH, Bauch J, Stettin A (1998) Uptake of mineral elements in spruce—a microprobe study. *Endocytobiosis Cell Res* 12:195–199
- Kuhn AJ, Schroder WH, Bauch J (2000) The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots. *Planta* 210:488–496
- Lax A, Roig A, Costa F (1986) A method for determining the cation-exchange capacity of organic materials. *Plant Soil* 94:349–355
- Legout A (2008) Cycles Biogéochimiques et bilans de fertilité minérale en hêtraies de plaine. AGROPARISTECH-ENGREF, Nancy, p 281
- Legout A, Legout C, Nys C, Dambrine E (2009) Preferential flow and slow convective chloride transport through the soil of a forested landscape (Fougères, France). *Geoderma* 151:179–190
- Likens GE, Driscoll CT, Buso DC, Siccama TG, Johnson CE, Lovett GM, Fahey TJ, Reiners WA, Ryan DF, Martin CW, Bailey SW (1998) The biogeochemistry of calcium at Hubbard Brook. *Biogeochemistry* 41:89–173
- Liu S, Munson RK, Johnson DW, Gherini SA, Summers KV, Hudson RJM, Wilkinson KJ, Pitelka LF (1991) The Nutrient Cycling Model (NuCM): overview and application. In: Johnson DW, Lindberg SE (eds) *Atmospheric deposition and forest nutrient cycling: a synthesis of the Integrated Forest Study*. Springer, New-York, pp 583–609
- Mareschal L (2008) Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur minéralogie: bilan après 28 ans dans le site expérimental de Breuil (Morvan). In: *Ressources Procédés Produits Environnement*. Université Henri Poincaré, Nancy, p 328
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. Academic, London, p 889
- Martinez-Meza E, Whitford WG (1996) Stemflow, throughfall and channelization of stemflow by roots in three Chihuahuan desert shrubs. *J Arid Environ* 32:271–287
- McLaughlin JW, Phillips SA (2006) Soil carbon, nitrogen, and base cation cycling 17 years after whole-tree harvesting in a low-elevation red spruce (*Picea rubens*)-balsam fir (*Abies balsamea*) forested watershed in central Maine, USA. *Forest Ecol Manag* 222:234–253
- McLaughlin JW, Calhoun EBW, Gale MR, Jurgensen MF, Trettin CC (2011) Biogeochemical cycling and chemical fluxes in a managed northern forested wetland, Michigan, USA. *Forest Ecol Manag* 261:649–661
- Metzner R, Thorpe MR, Breuer U, Blumler P, Schurr U, Schneider HU, Schroeder WH (2010) Contrasting dynamics of water and mineral nutrients in stems shown by stable isotope tracers and cryo-SIMS. *Plant Cell Environ* 33:1393–1407
- Midwood AJ, Proe MF, Harthill JJ (2000) Use and analysis by thermal ionisation mass spectrometry of Mg-26 and K-41 to assess mineral uptake in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Analyst* 125:487–492
- Miller DE, Watmough SA (2009) Soil acidification and foliar nutrient status of Ontario's deciduous forest in 1986 and 2005. *Environ Pollut* 157:664–672
- Moukoui J (2006) Effet des essences forestières sur la biodégradation des matières organiques: impacts sur la dynamique et le cycle du carbone, de l'azote et des éléments minéraux. Université Henri Poincaré, Nancy, p 255
- Page BD, Bullen TD, Mitchell MJ (2008) Influences of calcium availability and tree species on Ca isotope fractionation in soil and vegetation. *Biogeochemistry* 88:1–13
- Pogge von Strandmann PAE, Burton KW, James RH, van Calsteren P, Gislason SR, Sigfusson B (2008) The influence of weathering processes on riverine magnesium isotopes in a basaltic terrain. *Earth Planet Sci Lett* 276:187–197
- Proe MF, Midwood AJ, Craig J (2000) Use of stable isotopes to quantify nitrogen, potassium and magnesium dynamics in young Scots pine (*Pinus sylvestris*). *New Phytol* 146:461–469
- Ranger J, Turpault M-P (1999) Input–output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *Forest Ecol Manag* 122:139–154
- Ranger J, Andreux F, Bienaimé S, Berthelin J, Bonnaud P, Boudot JP, Bréchet C, Buée M, Calmet J, Chaussod R, Gelhaye D, Gelhaye L, Gérard F, Jaffrain J, Lejon D, Le Tacon F, Lévêque J, Maurice J, Merlet D, Moukoui J, Munier-Lamy C, Nourrisson G, Pollier B, Ranjard L, Simonsson M, Turpault M P, Vairelles D, Zeller B (2004) Effet des substitutions d'essence sur le fonctionnement organominéral de l'écosystème forestier, sur les communautés microbiennes et sur la diversité des communautés fongiques mycorrhiziennes et saprophytes (cas du dispositif de Breuil - Morvan), Rapport final contrat INRA-GIP Ecofor 2001-24, No. INRA 1502A. INRA Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (UR 1138), 54280 Champenoux
- Ranger J, Bonnaud P, Bouriaud O, Gelhaye D, Picard JF (2008) Effects of the clear-cutting of a douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) plantation on chemical soil fertility. *Ann For Sci* 65:303–316
- Russell WA, Papanastassiou DA, Tombrello TA (1978) Ca isotope fractionation on Earth and other solar-system materials. *Geochim Cosmochim* 42:1075–1090
- Sturup S, Hansen HR, Gammelgaard B (2008) Application of enriched stable isotopes as tracers in biological systems: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 390:541–554
- Sverdrup H, Warfvinge P (1988) Weathering of primary silicate minerals in the natural soil environment in relation to a chemical weathering model. *Water Air Soil Pollut* 38:387–408
- Sverdrup H, Thelin G, Robles M, Stjernquist I, Sörensen J (2006) Assessing nutrient sustainability of forest production for different tree species considering Ca, Mg, K, N and P at Björnstorp Estate. *Sweden Biogeochemistry* 81:219–238
- Tait K, Sayer JA, Gharieb MM, Gadd GM (1999) Fungal production of calcium oxalate in leaf litter microcosms. *Soil Biol Biochem* 31:1189–1192
- Tipper ET, Louvat P, Capmas F, Galy A, Gaillardet J (2008) Accuracy of stable Mg and Ca isotope data obtained by MC-ICP-MS using the standard addition method. *Chem Geol* 257:65–75
- Turpault MP, Nys C, Calvaruso C (2009) Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma* 153:147–154
- van der Heijden G, Legout A, Nicolas M, Ulrich E, Johnson DW, Dambrine E (2011) Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change. *Forest Ecol Manag* 261:730–740

- Vialette Y (1962) Contribution à l'étude géochronologique par la méthode au Sr des principaux massifs de granites et de migmatites du massif central français. *Ann Fac Sci Clermon-Ferrand* 6:88
- Vialette Y (1965) Granitisation hercynienne dans le massif central français. *Sci Terre*:369–382
- Wallman P, Svensson M, Sverdrup H, Belyazid S (2005) ForSAFE—an integrated process-oriented forest model for long-term sustainability assessments. *Forest Ecol Manag* 207:19–36
- Warfvinge P, Sverdrup H (1992) Calculating critical loads of acid deposition with PROFILE—a steady-state soil chemistry model. *Water Air Soil Poll* 63:119–143
- Warfvinge P, Kalkengren-Grerup U, Sverdrup H, Andersen B (1993) Modeling long term cation supply in acidified forest stands. *Environ Pollut* 80:209–221
- Weatherall A, Proe MF, Craig J, Cameron AD, McKay HM, Midwood AJ (2006a) Tracing N, K, Mg and Ca released from decomposing biomass to new tree growth. Part I: a model system simulating harvest residue decomposition on conventionally harvested clearfell sites. *Biomass Bioenergy* 30:1053–1059
- Weatherall A, Proe MF, Craig J, Cameron AD, McKay HM, Midwood AJ (2006b) Tracing N, K, Mg and Ca released from decomposing biomass to new tree growth. Part II: a model system simulating root decomposition on clearfell sites. *Biomass Bioenergy* 30:1060–1066
- Weatherall A, Proe MF, Craig J, Cameron AD, Midwood AJ (2006c) Internal cycling of nitrogen, potassium and magnesium in young Sitka spruce. *Tree Physiol* 26:673–680
- Wiegand B A, Chadwick O A, Vitousek P M, Wooden JL (2005) Ca cycling and isotopic fluxes in forested ecosystems in Hawaii. *Geophys Res Lett* 32
- Yanai RD, Blum JD, Hamburg SP, Arthur MA, Nezat CA, Siccama TG (2005) New insights into calcium depletion in northeastern forests. *J For* 103:14–20



VI



Chapitre VI – Transfert vertical des traceurs dans le profil de sol

Les premiers résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique présentés dans le chapitre précédent montrent que l'incorporation des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca dans les cycles biogéochimiques est complexe. Les transferts de traceurs dans le profil de sol pourraient être à la fois lents (forte rétention dans la litière au sol, chapitre V) et rapides (hypothèse de transferts de Mg et Ca dans les flux préférentiels d'eau mis en évidence dans le chapitre III). Ce chapitre a pour objectif d'étudier les mécanismes de transfert vertical de Mg et de Ca depuis la litière au sol et dans le profil de sol

I. Résumé de l'étude

I.1. Introduction

La matière organique joue un rôle essentiel dans la durabilité de la fertilité chimique des sols forestiers. Tout d'abord, la couche de litière au sol représente une importante source de calcium et de magnésium dans les écosystèmes forestiers. Cette source est renouvelée par le flux de calcium et de magnésium au travers la chute annuelle de litière qui est l'un des plus importants flux dans les écosystèmes forestiers tempérés (Miller *et al.*, 1979; Stevens *et al.*, 1989; Likens *et al.*, 1998; Pedersen and Bille-Hansen, 1999; Hansen *et al.*, 2009). La décomposition lente de la litière libère progressivement le calcium et le magnésium évitant ainsi leur perte par drainage (Blair, 1988; Bockheim *et al.*, 1991; Binkley, 2002; Dijkstra, 2003; Osono and Takeda, 2004). La couche de litière au sol est donc une source importante de Mg et de Ca pour la nutrition des arbres (Ranger *et al.*, 1997; Likens *et al.*, 1998; Farkaš *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, accepted FEM).

Ensuite la matière organique peut fortement contribuer au stockage du calcium et du magnésium dans le sol grâce à la capacité d'échange cationique de la matière organique. Les stocks échangeables dans l'humus sont par exemple systématiquement mesurés en Suède (Olsson *et al.*, 1996; Hansson *et al.*, 2011). Dans le profil de sol, une part non-négligeable de la CEC peut être d'origine organique. Par exemple, 19-45% de la CEC totale du sol est d'origine organique d'après Helling *et al.* (1964), 49% d'après Thompson *et al.* (1989), 85% d'après Turpault *et al.* (1996) et 75-85% d'après Oorts *et al.* (2003).

Les objectifs de ce chapitre sont (1) d'étudier les mécanismes de rétention et de libération du ^{26}Mg et de ^{44}Ca dans la litière au sol, (2) étudier le transfert vertical des traceurs dans le profil de sol et (3) discuter de l'importance de la matière organique et des flux préférentiels d'eau dans le drainage de magnésium et de calcium dans le profil de sol.

I.2. Principaux résultats

I.2.1. Rétention et remobilisation du magnésium et du calcium dans la couche de litière au sol

Les traceurs isotopiques du magnésium et du calcium ont été très rapidement retenus dans la couche de litière au sol, essentiellement composée de la couche OL de litière de l'année. Le jour suivant l'expérience de traçage, respectivement ~80% et ~100% du ^{26}Mg et ^{44}Ca appliqués étaient retenus dans la litière au sol. Les cations nutritifs ont vraisemblablement été retenus par la capacité d'échange cationique de la litière. Le ^{26}Mg et le ^{44}Ca ont ensuite été progressivement libérés durant les deux ans après l'apport des traceurs. En mars 2012, 8% du ^{26}Mg et 33% du ^{44}Ca étaient encore retenus dans la litière au sol.

Les traceurs du magnésium et du calcium ont pu être libérés par échange ionique avec les eaux de pluie ou pluviolessivats ou par minéralisation de la matière organique.

I.2.2. Rétention du magnésium et du calcium dans le sol

Les traceurs isotopiques du magnésium et du calcium ont progressivement été libérés de la couche de litière et ont ensuite été transférés dans le profil de sol. Le ^{26}Mg et le ^{44}Ca ont été rapidement retenus dans les horizons superficiels du sol. Une immobilisation microbienne (Chapitre VIII) a fortement contribué à retenir le magnésium dans les horizons superficiels du sol. Cependant, le Mg est plus mobile que le Ca de sorte qu'une plus grande proportion de ^{26}Mg a migré vers les horizons plus profonds. En mars 2012, $\sim 35\%$ du ^{26}Mg et $\sim 38\%$ du ^{44}Ca étaient retenus dans la couche 0-5 cm du sol, $\sim 17\%$ du ^{26}Mg et $\sim 7\%$ du ^{44}Ca dans la couche 5-10cm. En dessous de 10 cm de profondeur, moins de 2% du ^{44}Ca mais $\sim 15\%$ du ^{26}Mg ont été retrouvés.

I.2.3. Différents types de transferts de magnésium et de calcium dans le profil de sol

Différents types de transfert de Mg et de Ca dans le profil de sol ont été mis en évidence. Ces différents types de transfert observés sont probablement expliqués par le type de flux d'eau (flux préférentiel ou matriciel) et la contribution relative de la CEC organique et de la CEC minérale. La variabilité spatiale de ces différents types de transfert était élevée probablement à cause de la forte variabilité spatiale des propriétés physiques (porosité totale du sol, distribution des tailles de pores, granulométrie...) et chimiques (taux de matière organique, distribution des minéraux...). Quelle que soit la vitesse de transfert de l'eau, les processus expliquant l'élution des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca dans le profil semblent identiques. De façon surprenante, les transferts rapides semblent en effet également impactés par la présence d'une capacité d'échange, qu'elle soit organique ou minérale. Ainsi, aucune perte de ^{26}Mg et de ^{44}Ca par drainage profond (> 60 cm) n'a été mesurée durant les deux ans de suivi après l'apport des traceurs.

II. The role of soil organic matter in the biogeochemical cycling of Mg and Ca in forest ecosystems on base poor soils

Gregory van der Heijden^{(1)*}, Arnaud Legout⁽¹⁾, Benoît Pollier⁽¹⁾, Jacques Ranger⁽¹⁾, Etienne Dambrine⁽²⁾

Article en préparation pour BIOGEOCHEMISTRY

(1) INRA – UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes forestiers, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France

(2) INRA – UMR 042 CARTEL, Université de Savoie, Centre Interdisciplinaire Scientifique de la Montagne, Belledonne 226, 73376 Le Bourget-du-Lac Cedex

*Corresponding author

Tel : 03 83 39 73 27

Fax : 03 83 39 40 76

gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr

Abstract

Using nutrient budgets, it has been proven that atmospheric deposition of Mg and Ca sustains the fertility of forest ecosystems on base-poor soils. However the fate of this nutrient input within the ecosystem was presently unknown. Stable isotopes of magnesium and calcium (^{26}Mg and ^{44}Ca) were used to trace the dynamics of rainfall Mg and Ca in the forest soil of a 35 year-old beech stand. The objective of the present study was to assess Mg and Ca retention and release mechanisms in the organic layer and their leaching through the soil profile.

Rainfall Mg and Ca were strongly and rapidly retained mainly by ion exchange in the thin OL litter layer. Mg and Ca release mechanisms differed: Mg was mainly released by ion exchange while Ca was mainly released by organic matter mineralization. As a result, two years after the application of tracers (2012), 92% of ^{26}Mg and 67% of ^{44}Ca was released and transferred to the soil or taken up by trees. The vertical transfer of Mg was very slow: only 15% of ^{26}Mg was found below 15cm depth in 2012. Ca was slower than ^{26}Mg : only 9% of ^{44}Ca was found below 5cm depth. Although matrix flow was the main vertical transfer process of Ca and Mg, preferential transfer in macropores occurred. Overall, Mg was more rapidly leached through the soil profile than Ca because the soil CEC was mainly composed of organic charges which affinity for Ca is much higher than for Mg.

Organic matter of the litter-layer and in the soil profile played an essential role in the retention of throughfall Mg and Ca and their cycling within the forest ecosystem.

1. Introduction

Calcium and magnesium are two essential elements to forest soil fertility. Their amount on the cation exchange capacity directly influences soil base saturation and pH. As divalent cations, they participate in the binding of negatively charged particles such as clays and organic compounds and therefore stabilize soil structure and aggregates. Calcium is also essential for soil biological activity of many soil organisms, such as earthworms, which influence considerably litter decomposition (Edwards and Bohlen, 1996). Finally calcium and magnesium are essential for plant nutrition (Marschner, 1995).

In most forest ecosystems, stores of bioavailable Ca and Mg originate from inputs by atmospheric deposition and mineral weathering and vary in relation to leaching and biomass immobilization. In numerous situations, nutrient budget approaches have questioned the sustainability of plant available Mg and Ca pools. Ongoing Ca and Mg depletion in soils, either related to decreasing atmospheric deposition rates (e.g. Likens et al., 1996; van der Heijden et al., 2011) or to increased leaching (Dambrine et al., 1998; Thimonier et al., 2000; Bailey et al., 2005) or biomass immobilization (Johnson et al., 2008) was observed in many ecosystems throughout the world. In recent years, the demand for bio-energy has strongly supported increasing short rotation silviculture and whole-tree harvesting (Ericsson, 2004; Puech, 2009). Soil nutrient and carbon pools may be further depleted in such a context.

In forest ecosystems, due to its chemical and physical properties, organic matter plays an essential role in sustaining forest soil chemical fertility. Firstly, the litter layer represents an important nutrient pool than can be released by organic matter decomposition/mineralization. The annual flux of organic matter as litterfall and its incorporation by roots and soil dwelling organisms provides carbon and nutrients to the different soil layers. The dynamics of C and N from litter has been intensively studied in most forest ecosystems. Studies dealing with Mg and Ca are less frequent. Magnesium and calcium in litterfall represents one of the highest Mg and Ca fluxes within temperate forest ecosystems (Miller et al., 1979; Stevens et al., 1989; Likens et al., 1998; Pedersen and Bille-Hansen, 1999; Hansen et al., 2009). Decomposition of organic matter and the release of Mg and Ca from decomposing organic layer are slow (Blair, 1988; Bockheim et al., 1991; Binkley, 2002; Dijkstra, 2003; Osono and Takeda, 2004) thus limiting nutrient losses through leaching. Mg is more readily released from litter than Ca, which is more closely related to weight loss (Attiwill, 1968; Gosz et al., 1973; Dijkstra, 2003). Some studies have even shown a net accumulation of Ca in the first years of litter decomposition (Bockheim et al., 1991; van Wesemael, 1993). As a result of such slow processes, the organic layer represents an important source of Mg and Ca for plant uptake (Ranger et al., 1997; Likens et al., 1998; van der Heijden et al., accepted FEM).

Secondly, soil organic matter may strongly contribute to the storage of nutrients thanks to the organic cationic exchange capacity (organic CEC). Indeed, organic compounds may be negatively charged (carboxyl functions) and thus may allow ion exchange processes. Organic CEC can be found in the litter layer and also in topsoil. Exchangeable Mg and Ca pools in the humus layer have not been systematically accounted for in previous studies. However, exchangeable Mg and Ca pools in the humus layer represent a non-negligible source (Olsson et al., 1996; Hansson et al., 2011) and may be readily available for plant uptake. In soils, Thompson

et al. (1989) found that 49% of soil total CEC was organic CEC, 19-45% (Helling et al., 1964), 75-85% (Oorts et al., 2003) and 85% (Turpault et al., 1996).

Considering both functions of organic matter previously detailed (source and storage of nutrients), we may suppose that a modification of the organic matter pool in forest ecosystem may impact soil chemical fertility. Several factors are known to influence this pool. Indeed, total soil organic matter and distribution in the soil profile may be strongly impacted by silvicultural practices such as clear felling (Johnson et al., 1991; Johnson et al., 1997; Johnson and Curtis, 2001; Das Gupta and DeLuca, 2012) and/or climate change (Kirschbaum, 1995; Melillo et al., 2011). In this context, linking organic matter, in both the litter layer and soil, to the nutrient cycling of Mg and Ca is essential to understand and predict the impact of ecosystem constraints on soil fertility.

An *in situ* ecosystem-scale multi-isotopic (^2H , ^{26}Mg and ^{44}Ca) tracing experiment was carried out in a 35-yr-old beech plot at the Breuil-Chenue experimental site. Preliminary results have shown that the organic layer plays an important role in the retention of Mg and Ca in rainfall. We hypothesize that ^{26}Mg and ^{44}Ca are mainly retained on the cationic exchange capacity in the organic layer. The main objective of the present study was to determine the role of organic matter, in both the litter and soil layers, in the incorporation of rainfall Mg and Ca in the soil and in biogeochemical cycles. The detailed objectives were (1) to investigate the ^{26}Mg and ^{44}Ca retention and leaching processes in the organic layer, (2) to study the vertical transfer of ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers in the soil profile and (3) to discuss the importance of organic matter and preferential water flow in the drainage losses of Mg and Ca from the soil profile.

2. Material and methods

2.1. Study site

The experimental site of Breuil-Chenue forest (hereafter named Breuil-Chenue site) is located in the Morvan Mountains, Burgundy, France (latitude $47^{\circ}18'10''$, longitude $4^{\circ}4'44''$). The elevation is 640 m, the annual rainfall 1180 mm, the mean annual potential evapo-transpiration (PET) 750 mm and the mean annual temperature 9°C (computed over the period 2006-2010). The soil is a sandy Alucrisol (Alumic Cambisol; WRB FAO) displaying micro-podzolisation features in the upper mineral horizon (Ranger et al., 2004). The soil parent material is granite, containing 23.5% quartz, 44% K-feldspar, 28.5% plagioclase, 1.6% biotite and 1.6% muscovite (Mareschal, 2008). In 1975, part of the native forest (coppice with standards) located on a homogeneous soil type was clear-cut, heaving swathing was carried out. Effectively, all brash and the humus layer were removed from the plot. Plots covering 1000 m^2 were planted with different species in 1976. A plot of native forest was left un-cut.

The present study focused on the beech plot (*Fagus sylvatica* L). The humus type in this plot was described in 2003 as a mesomull (Brethes et al., 1995): the OL-layer was 0.5 to 1cm thick, the OF-layer was very thin and discontinuous and no OH-layer was observed (Moukoui, 2006). The humus layer (hereafter referred to as the litter layer) represented $22\ 000\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ of dry matter, $12\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ of Mg and $54\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ of Ca. Soil chemical properties were measured from 16 soil profiles (0 to 70cm depth) collected in 2001. A description of soil properties is given in

Table VI-1. The proportion of organic CEC in total soil CEC was estimated by fitting the following equations to the soil analysis data:

$$CEC_{total} = a + b \times Carbon(\%) + c \times Clay(\%) \quad (1)$$

Where CEC_{total} is the total measured cationic exchange capacity ($cmol_c.kg^{-1}$), $Carbon(\%)$ the soil total carbon content (%), $Clay(\%)$ the soil clay content (%) and a , b and c the fitted parameters. The parameters (a , b and c) were assumed to be constant with depth and were fitted using a linear regression model (Table VI-2) (Pratt, 1961; Helling et al., 1964; Wilding and Rutledge, 1966; Yuan et al., 1967; Wright and Foss, 1972; Evans, 1982)

Horizon	Depth <i>cm</i>	Bulk density $\phi < 2mm$	Soil Texture			Soil cationic exchange capacity						
			Sand %	Silt %	Clay %	C <i>g.kg⁻¹</i>	C/N	ECEC <i>cmolc.kg⁻¹</i>	Organic CEC %	BS %	Mg <i>cmolc.kg⁻¹</i>	Ca <i>cmolc.kg⁻¹</i>
A1/E	0-5	0.50	57.6	21.8	20.6	72.6	18.0	8.66	74	19.4	0.23	0.54
A1-A1/Bp	5-10	0.64	60.2	21.5	18.4	46.1	18.1	7.23	63	10.9	0.13	0.15
Sal 1	10-15	0.67	58.0	23.6	18.4	34.2	18.1	5.43	57	7.9	0.08	0.07
Sal 2	15-25	0.89	60.0	24.1	16.0	23.3	17.9	4.08	51	5.8	0.04	0.02
Sal 2	25-40	0.90	57.8	24.7	17.5	14.0	17.1	3.13	38	7.4	0.03	0.02
Sal 3	40-55	1.08	55.7	25.8	18.5	-	-	3.11	-	8.1	0.02	0.01
II Sal 4	55-70	1.05	57.3	25.3	17.5	-	-	3.32	-	8.1	0.03	0.02

Table VI-1: Breuil-Chenu experimental site soil description. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2mm diameter (mass of soil particles smaller than 2mm/total volume of soil). Organic CEC is the relative contribution of soil organic matter to soil total ECEC (expressed in %) and was estimate with equation (1) (Table VI-2). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC).

	Estimate	Std. Error	Pr(> t)
a	-	-	NS
b	0.92191	0.075	<0.0001
c	0.12374	0.01818	<0.0001

$R^2=0.9881$

Table VI-2: Statistics for the fitted parameters of equation (1) predicting fine earth total CEC from soil carbon content (%) (b) and clay content (%) (c). Parameters were fitted with a linear regression model.

2.2. Multi-isotopic tracing experiment design

2.2.1. Application of the stable isotope tracers

A subplot of the beech plot (hereafter named tracing plot) was equipped in 2009 to carry out a tracing experiment on April 7th, 2010. The plot covered 80 m². The tracing solution (350ppm Mg; 200ppm Ca) was made up by dissolving enriched ²⁶MgO (99.25 atom%²⁶Mg) and ⁴⁴CaCO₃ (96.45atom%⁴⁴Ca). Twenty liters of the tracing solution were sprayed on the ground of the tracing plot representing a 0.25 mm rainfall event. 16 mm of deionised water were sprayed on the tracing plot over a period of 8 hours so as to simulate a natural rainfall event. The tracing plot was monitored during the two years after the application of tracers as detailed below. To

avoid a second application of tracer from litterfall, at each fall, all litterfall was collected by setting nets around each tree. Litterfall was replaced by fresh litter collected in the second 35 year-old beech plot of the Breuil-Chenue site.

2.2.2. Isotope ratio notation

Measured isotopic compositions of samples are expressed with the absolute value of the isotope ratio ($^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) or in permil deviations relative to the Mg and Ca reference ratios (DSM3 (Galy et al., 2003) and NIST SRM 915a respectively):

$$\delta^{26/24}\text{Mg} = \left\{ \left(\frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3}} - 1 \right\} \times 1000 \quad (2)$$

$$\delta^{44/40}\text{Ca} = \left\{ \left(\frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{NIST915a}} - 1 \right\} \times 1000 \quad (3)$$

To account for ^{26}Mg and ^{44}Ca applied tracers in each ecosystem compartment, it is necessary to distinguish ^{26}Mg and ^{44}Ca present naturally in Mg and Ca pools from ^{26}Mg and ^{44}Ca present due to the application of the tracers. Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca in a sample or ecosystem compartment was calculated assuming that natural isotopic composition (control isotopic composition) was 0‰ for both Mg and Ca:

$$\text{excess}(\text{}^y\text{X})_{\text{sample}} = [\text{X}]_{\text{sample}} \times (\% \text{}^y\text{X}_{\text{sample}} - \% \text{}^y\text{X}_{\text{nat}}) \quad (4)$$

where $\text{excess}(\text{}^y\text{X})$ is the excess of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) due to the application of the tracer in the sample (or compartment), $[\text{X}]_{\text{sample}}$ the concentration or total amount of total element (Mg or Ca) in the sample (or compartment), $\% \text{}^y\text{X}_{\text{sample}}$ the atom percent of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) in the sample (or compartment) and $\% \text{}^y\text{X}_{\text{nat}}$ the atom percent of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) at natural abundance (assumed 0‰). Atom percent of the tracer isotopes are calculated as follows:

$$\% \text{}^{26}\text{Mg} = \frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{1 + ^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg} + ^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \quad (5)$$

$$\% \text{}^{44}\text{Ca} = \frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{1 + ^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \quad (6)$$

where $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ are the measured ratios in samples, $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$, $^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, $^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, $^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ and $^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ were assumed to be constant and equal to terrestrial values: 0.1266 for $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$, 6.677×10^{-3} for $^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, 1.3926×10^{-3} for $^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, 4.1262×10^{-5} for $^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ and 1.929×10^{-3} for $^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ (Hoefs, 2009). Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca is expressed in $\text{mol}\cdot\text{ha}^{-1}$ or in percentage of applied tracers.

2.3. Measuring tracers in the ecosystem

2.3.1. Soil solution sampling

Soil solutions were collected every 28 days with hand-made PEHD zero-tension lysimeters (ZTL) placed between the litter layer and the soil surface (hereafter referred to as 0 cm depth)

and at 10cm depth (3 replicates), and with ceramic tension-cup lysimeters (TCL; Oikos Umweltanalytik GBR, Ceramic P80, porosity 45 μm , alumina-silica), with an applied pressure of 0.6 bars, at 15, 30 and 60cm depth (4 replicates/depth). Solutions were stored in 60mL polypropylene bottles at 4°C.

2.3.2. Sampling of the litter and soil layers

During two years after the tracing experiment, soil profiles were sampled with a cylindrical corer (sampling dates are given in Table VI-3) to measure the Mg and Ca isotopic composition of the litter-layer, the soil exchangeable pools and microbial biomass (van der Heijden et al., submitted Ecosystems). The litter-layer (L+F) was collected directly above each sampled soil profile. Litter-layer samples were oven-dried (65°C) and milled. $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ in the bulk litter-layer were measured by digesting litter-layer samples with 50% nitric acid. $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ in the exchangeable pool of the litter-layer were measured using ammonium acetate as extractant: 2.5g of dried litter-layer were shaken with 50mL of 1 mol.L⁻¹ ammonium acetate for 1h. Extraction solutions were then filtered.

Date	Cumulated matrix water flow (mm)	Replicates	Sampled depth	Litter layer	Soil extractions
08/04/2010	17.8	4	15 cm	Yes	
14/04/2010	18.7	8	15 cm	Yes	Yes
04/05/2010	38.3	8	15 cm	Yes	Yes
18/05/2010	63.9	8	15 cm	Yes	Yes
15/06/2010	96.7	8	15 cm	Yes	Yes
15/07/2010	115.9	8	30cm	Yes	Yes
10/08/2010	126.1	8	30cm	Yes	
08/09/2010	158	8	15cm	Yes	Yes
04/10/2010	174.6	8	30cm	Yes	
04/11/2010	217.4	8	30cm	Yes	Yes
03/01/2011	361.3	8	30cm	Yes	
22/02/2011	429.5	8	30cm	Yes	
22/03/2011	481	8	45cm	Yes	Yes
19/04/2011	496.5	8	45cm	Yes	
16/05/2011	502.1	8	45cm	Yes	
11/07/2011	525.1	8	45cm	Yes	
05/09/2011	567.8	4	60cm	Yes	Yes
30/11/2011	646	4	60cm	Yes	
21/03/2012	884.6	4	60cm	Yes	Yes

Table VI-3: Summary of soil and litter sampling dates, number of replicates and depth sampled. The cumulated matrix water flow (mm) at each sampling date is also given (van der Heijden et al., accepted Geoderma).

Sampled soil profiles were divided into 5 cm-thick layers progressively down to 60cm depth (Table VI-3). Exchangeable $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ were measured after two consecutive extractions: 7.5 g of field fresh soil was shaken with 50mL of 1 mol.L⁻¹ ammonium acetate for 1h then centrifuged. The supernatant was collected after each extraction and mixed together before being filtered. Soil microbial biomass ^{26}Mg and ^{44}Ca (Mg_{mic} and Ca_{mic}) were measured

using a CFE procedure: 7.5 g of field-fresh soil was weighed in glass vials and fumigated with chloroform for 24h. Unfumigated samples served as controls. Fumigated samples were extracted following the same protocol as CEC extractions (detailed above). Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca was computed for both fumigated and unfumigated samples with equation (3) and (4). Mg_{mic} , Ca_{mic} , $^{26}Mg_{mic}$ and $^{44}Ca_{mic}$ were calculated based on 35°C oven-dry soil by subtracting unfumigated soil extractions (Mg_{exch} and Ca_{exch}) from fumigated soil extractions. Fumigated extractions were carried out on soil samples in the 0-30 cm soil layer.

2.3.3 Sample analysis methods

Ca and Mg concentrations in samples (soil solutions, soil CEC extractions, biomass digests) were measured by ICP-AES (Jobin-Yvon 180 ULTRACE) and $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ isotope ratios were measured with ICP-MS (Bruker 820MS) following isotope analysis methods described by van der Heijden et al. (accepted Plant and Soil). Given natural isotope variations and ICP-MS measurement precision, a tracer detection limit was set for $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ at 10‰.

2.4. ^{26}Mg and ^{44}Ca pool and flux calculation methodology

Tracer pools were estimated by applying equation (4) to Mg and Ca pools in the litter and soil layers. Mg and Ca pools in the litter and soil layers were measured in 2001 and Mg and Ca pool size change was assessed over 2001-2012 with an isotopic dilution technique (van der Heijden et al., submitted Ecosystems).

Water fluxes in the soil were modelled with BILJOU, a pool and flux water balance model adapted to forest hydrology. A detailed description of BILJOU is given by Granier *et al.* (1995; 1999). Model outputs include water fluxes, both matrix and preferential water flow, at different depths as described in a previous paper (van der Heijden et al., accepted Geoderma). Tracer fluxes at 15 cm, 30 cm and 60cm depth were calculated by coupling excess ^{26}Mg and ^{44}Ca concentrations in TCL soil solutions collected with modelled matrix water flow at each depth. Tracer fluxes at 0 cm and 10 cm depth were calculated by coupling excess ^{26}Mg and ^{44}Ca concentrations in ZTL soil solutions collected with the modelled preferential water flow at 10cm.

3. Results

3.1. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers in the litter-layer

^{26}Mg and ^{44}Ca tracers were immediately retained in the litter-layer (Figure VI-1). Indeed, one day after the tracing experiment (April 8th, 2010), most of the applied tracer was found in the litter-layer (80±19% of applied ^{26}Mg and 106±36% of applied ^{44}Ca). The release dynamics of both tracers differed. The ^{26}Mg pool decreased rapidly after the application of tracers. Two weeks after the application of tracers (April 20th, 2010), the ^{26}Mg pool in the litter-layer only represented 31±12% of applied ^{26}Mg . Thereon, the ^{26}Mg pool in the litter-layer decreased progressively but at a much slower rate. The release of ^{44}Ca from the litter-layer was much slower than ^{26}Mg . The retained ^{44}Ca pool only slightly decreased during the first year (68±26%

of ^{44}Ca was still retained in April 2011) and decreased during the second year. Two years after the tracing experiment (March 2012), this resulted in a much higher proportion of applied ^{44}Ca still retained in the litter-layer: $8.0 \pm 3.0\%$ of ^{26}Mg and $32.8 \pm 8.6\%$ of ^{44}Ca .

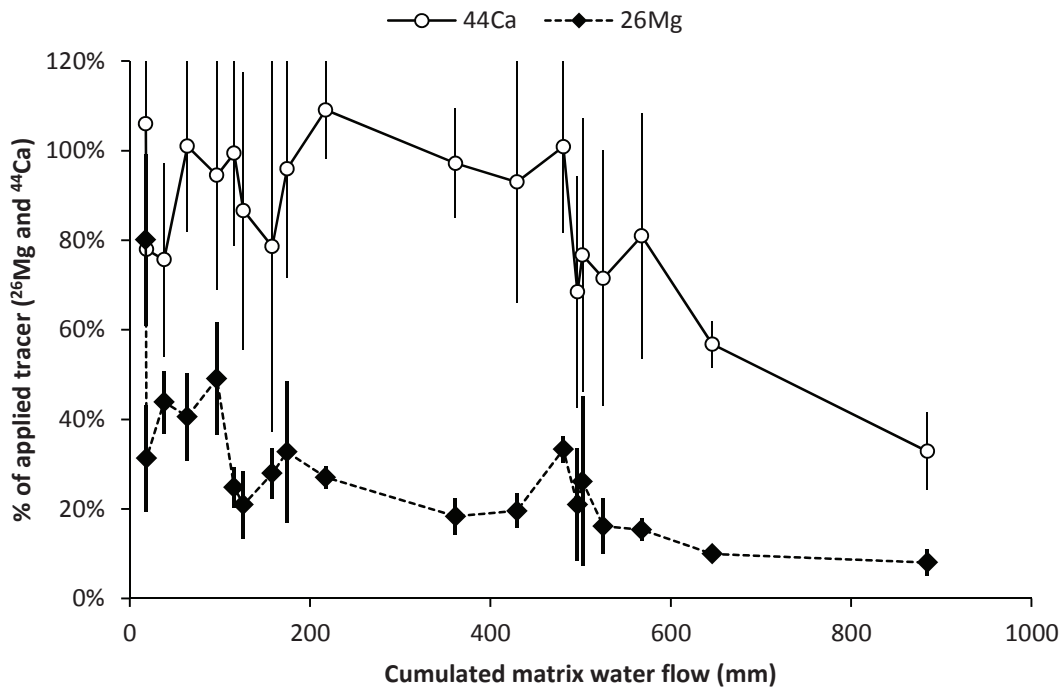


Figure VI-1: Total excess ^{26}Mg and ^{44}Ca pools in the litter-layer during the two years after the tracing experiment plotted against cumulated matrix water flow since the application of tracers (mm) (van der Heijden et al., accepted Geoderma) expressed in percentage of applied tracers. Error bars are standard deviations at each sampling date. Correspondence between sampling dates and cumulated matrix water flow is given in Table VI-3.

3.2. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers in the soil

While the amount of ^{26}Mg and ^{44}Ca retained in the litter-layer decreased, the amount of ^{26}Mg and ^{44}Ca retained in the soil (soil exchangeable and microbial biomass pool) increased during the two years after the tracing experiment (Figure VI-2; Figure VI-3). Four dates were selected to best represent the dynamics of retention of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the soil profile: May 2010 (beginning of the first vegetation season), November 2010 (after the first vegetation season), September 2011 (after the second vegetation season) and March 2012 (two years after the application of tracers).

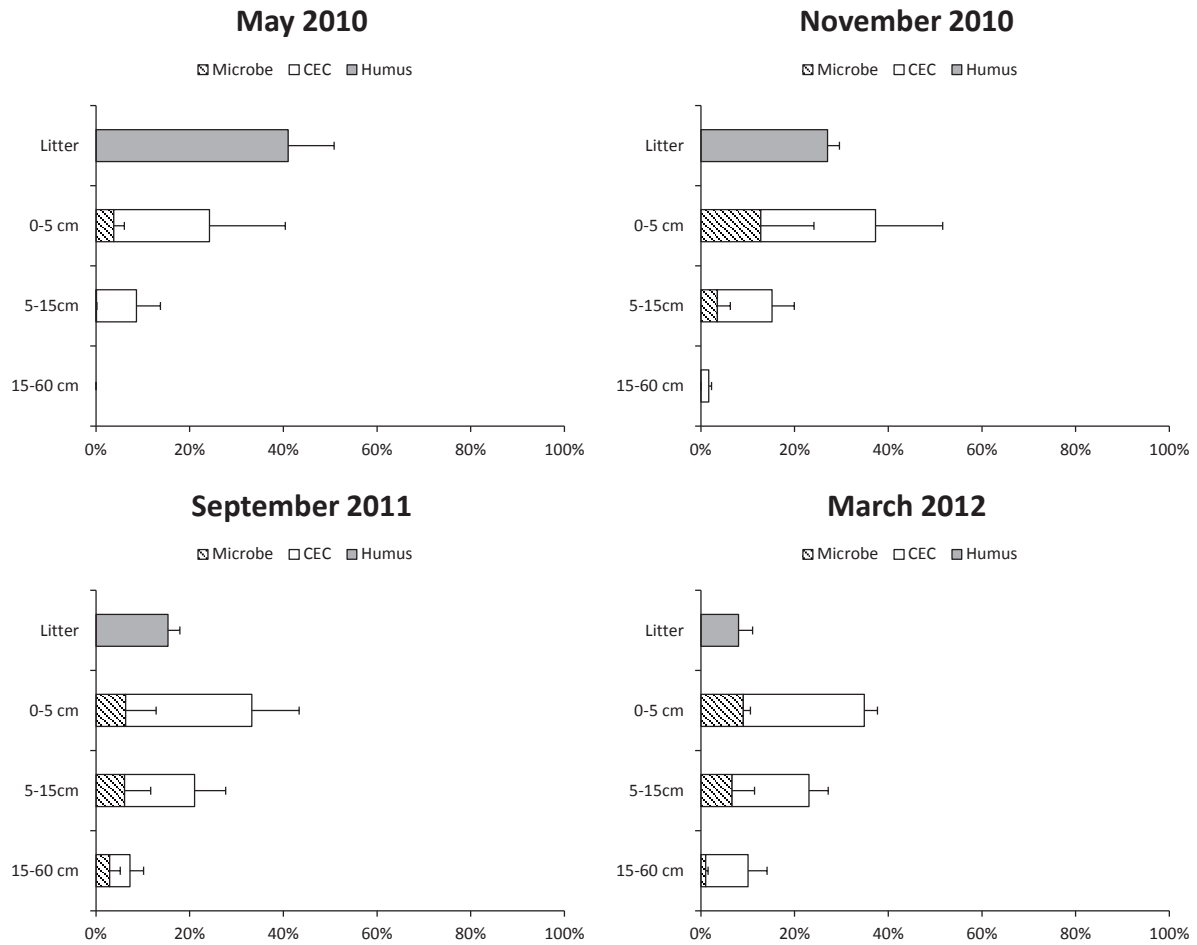


Figure VI-2: Excess ^{26}Mg in the litter-layer, and in the soil exchangeable and microbial biomass pools in the different soil layers (0-5 cm, 5-15 cm and 15-60 cm) during the two years after the tracing experiment expressed in percentage of applied tracers. Error bars represent standard deviations.

In May 2010, ~33% of applied ^{26}Mg was retained in the soil profile (Figure VI-2). Two years later (March 2012), 67% of applied ^{26}Mg was found in the soil profile. Between May 2010 and March 2012, ^{26}Mg in the soil profile increased by ~34% while ^{26}Mg in the litter-layer decreased by ~33%. A considerable amount of ^{26}Mg was rapidly retained in the 0-5 cm layer: in May 2010 ~24% of applied ^{26}Mg . The amount of ^{26}Mg retained in the 0-5 cm layer increased until November 2010 (~37%) and then remained stable until March 2012. ^{26}Mg transferred slowly downwards in the soil profile during the two years and ^{26}Mg pools in the deeper soil layers increased progressively. A small proportion of ^{26}Mg was immobilized in microbial biomass in May 2010 (~4%). However, this value increased until autumn 2010 (~16%) and remained stable thereon. Microbial biomass immobilized ^{26}Mg in the 0-30 cm layer however the 0-5cm layer represented ~50% of total ^{26}Mg immobilized in soil microbial biomass.

The ^{44}Ca pool in the soil profile increased throughout the two years from ~22% in May 2010 to ~47% in March 2012 (Figure VI-3), while the ^{44}Ca pool in the litter-layer decreased by ~68%. ^{44}Ca was mainly retained in the 0-5 cm layer ($38.1 \pm 10.5\%$) and only small amounts transferred to deeper soil layers. No ^{44}Ca was immobilized in microbial biomass.

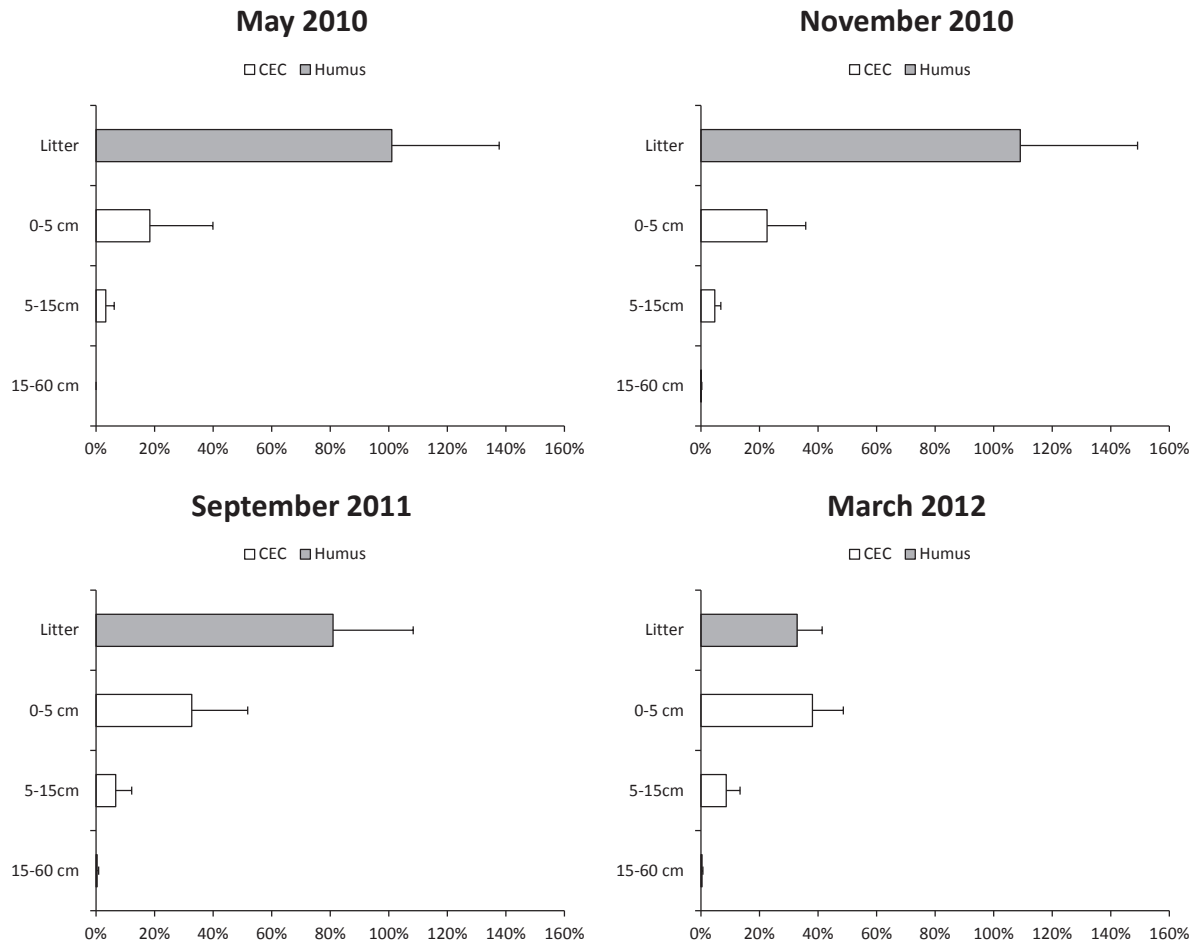


Figure VI-3: Excess ^{44}Ca in the litter-layer, the soil exchangeable and microbial biomass pools in the different soil (0-5 cm, 5-15 cm and 15-60 cm) during the two years after the tracing experiment expressed in percentage of applied tracers. Error bars represent standard deviations.

3.3. Monitoring of soil solution

3.3.1. Soil solutions collected with zero-tension lysimeters at 0 and 10cm depth

Soil solutions collected with zero-tension lysimeter (ZTL) at both 0cm (below the litter-layer) and 10cm depth were highly enriched in ^{26}Mg and ^{44}Ca (Figure VI-4). $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ were highest just after the tracing experiment: at 0cm, $\delta^{26}\text{Mg} \approx 3000\text{‰}$ and $\delta^{44}\text{Ca} \approx 1400\text{‰}$ and at 10cm depth, $\delta^{26}\text{Mg} \approx 2300\text{‰}$ and $\delta^{44}\text{Ca} \approx 1400\text{‰}$. $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ decreased until January 2011 (361 mm of cumulated matrix water flow) but thereon remained relatively stable only slightly decreasing over time: at 0cm, $\delta^{26}\text{Mg} \approx 500\text{‰}$ and $\delta^{44}\text{Ca} \approx 250\text{‰}$ and at 10cm depth, $\delta^{26}\text{Mg} \approx 300\text{‰}$ and $\delta^{44}\text{Ca} \approx 200\text{‰}$. Spatial and temporal variability was much higher in the ZTL collectors at 0cm than at 10cm. At both 0 and 10cm depth, $\delta^2\text{H}$ was highest just after the tracing experiment and rapidly decreased until August 2010. Thereon $\delta^2\text{H}$ at both 0 and 10cm depth was close to natural abundance $<0\text{‰}$.

3.3.2. Soil solutions collected with tension-cup lysimeters at 15 cm and 30 cm depth

The separation of ^{26}Mg and ^{44}Ca elution peaks from the ^2H elution peak was expressed with the difference (noted $\Delta_{\text{Mg-water}}$ and $\Delta_{\text{Ca-water}}$) of cumulated matrix water flow (mm) between the occurrence of the ^{26}Mg or ^{44}Ca elution peak and the ^2H elution peak.

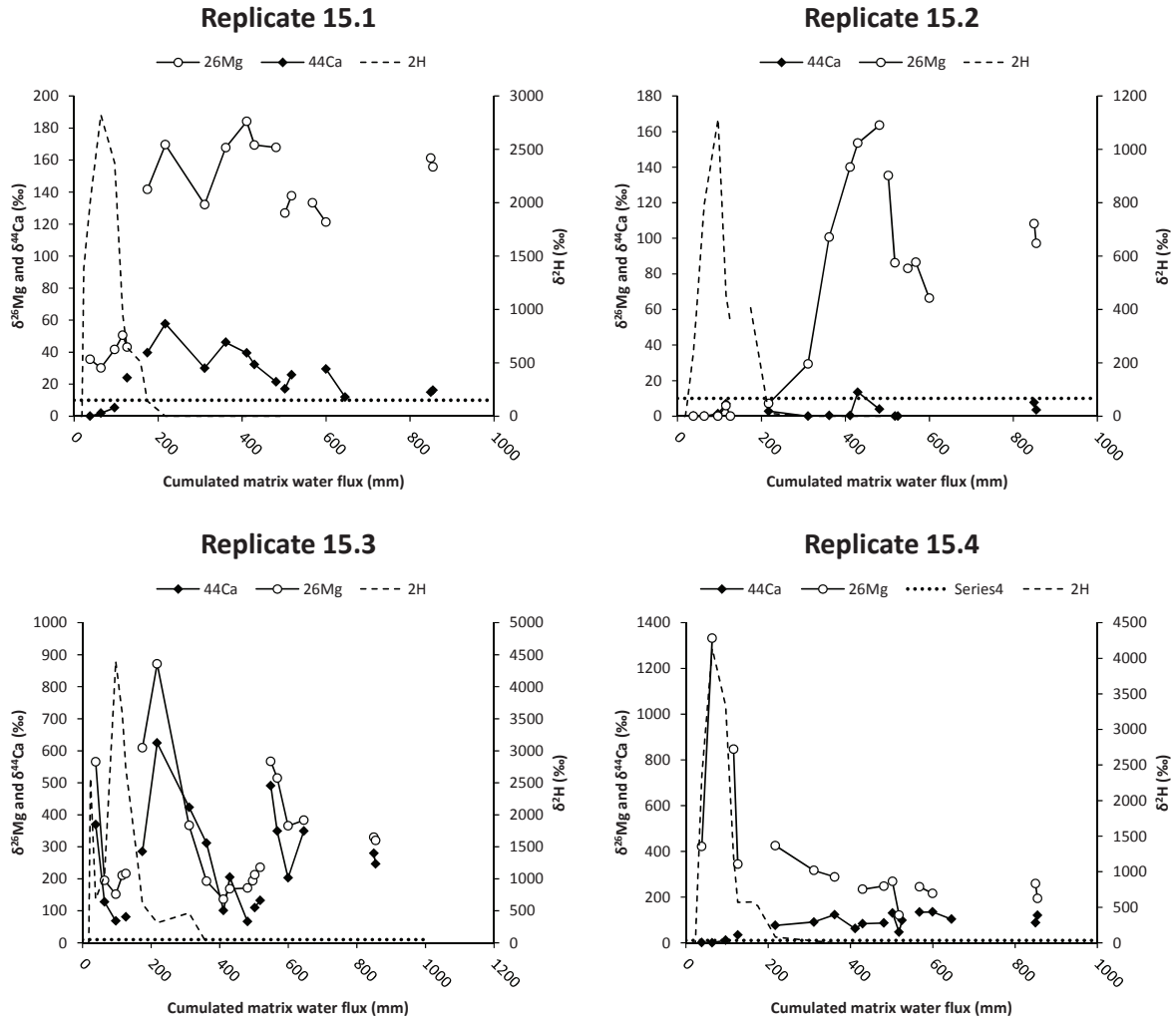


Figure VI-5: Isotopic composition ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$) of soil solution collected with tension-cup lysimeters at 15 cm depth plotted against cumulated matrix water flow since the application of tracers (mm) (van der Heijden et al., accepted Geoderma). The horizontal dotted line represents the analytical detection limit for excess ^{26}Mg and ^{44}Ca (10‰) (van der Heijden et al., accepted Plant and Soil). Correspondence between sampling dates and cumulated matrix water flow is given in Table VI-3.

At 15 cm depth, each tension-cup lysimeters (TCL) replicate showed a different sequence of ^{26}Mg , ^{44}Ca and ^2H elution peaks (Figure VI-5). **Replicate 15.1** The ^{26}Mg and ^{44}Ca elution peak were separated from ^2H : $\Delta_{\text{Mg-water}}=+347$ mm and $\Delta_{\text{Ca-water}}=+153$ mm. **Replicate 15.2.** The ^{26}Mg elution peak was well separated from the ^2H peak ($\Delta_{\text{Mg-water}}=+383$ mm). $\delta^{44}\text{Ca}$ was below the detection throughout the study period. **Replicate 15.3** High $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ were observed simultaneously to this first ^2H peak. A second ^2H elution peak was observed and a second ^{26}Mg and ^{44}Ca elution peak also occurred but was separated from the second ^2H peak ($\Delta_{\text{Mg-water}}=+120$

mm and $\Delta_{\text{Ca-water}}=+120$ mm). **Replicate 15.4** A ^{26}Mg elution peak occurred simultaneously with the ^2H peak ($\Delta_{\text{Mg-water}}=0$ mm). The ^{44}Ca elution peak was well separated from ^2H : $\delta^{44}\text{Ca}$ increased progressively during the study period and the maximum of the elution peak could not be distinguished.

		Flow velocity (mm.mm-1)			
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
15 cm	^2H	2.3	1.6	1.6	2.3
	^{26}Mg	0.4	0.3	0.7	2.3
	^{44}Ca	0.7	<0.2	0.7	<0.2
30 cm	^2H	3.2	1.7	13.6	3.2
	^{26}Mg	0.5	0.4	1.4	0.4
	^{44}Ca	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4

Table VI-4: ^2H , ^{26}Mg and ^{44}Ca transfer velocity in the soil profile (mm of tracer displacement per mm of cumulated matrix water flow) (van der Heijden et al., accepted Geoderma). Transfer velocities were computed using the maximum of elution peaks in soil solutions collected at 15 cm and 30 cm with tension-cup lysimeters.

At 30 cm depth, spatial variability was less pronounced for both ^{26}Mg and ^{44}Ca . **Replicates 30.1, 30.2 and 30.4** showed a similar sequence of ^{26}Mg , ^{44}Ca and ^2H elution peaks (Figure VI-6). $\delta^{26}\text{Mg}$ exceeded the detection limit after ~410 mm (January 2011), ~311 mm (December 2010) and ~430 mm (February 2011) in replicates 30.1, 30.2 and 30.4 respectively. $\delta^{26}\text{Mg}$ increased progressively during the study period for all three replicates. A ^{26}Mg peak occurred 480 and 600 mm (March to October 2011) in all three replicates. However, this event only represented the maximum of the elution peak for replicate 30.1. $\delta^{44}\text{Ca}$ remained under the detection limit until October 2011 (~600 mm). Beyond that date, low $\delta^{44}\text{Ca}$ was observed in replicate 30.2 (~35‰). And no data was available for replicate 30.1 and 30.4. **Replicate 30.3** The ^{26}Mg elution peak occurred simultaneously to the ^2H peak. $\delta^{26}\text{Mg}$ was maximum at the beginning of the study period and decreased continuously thereafter. $\delta^{44}\text{Ca}$ exceeded the detection limit in October 2010 (~175mm) and increased progressively throughout the study period. $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ in replicate 30.3 were much higher than the other replicates.

At 60cm depth and throughout the monitoring period, $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ in all replicates were below the detection limit (data not shown).

^2H , ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer flow velocities (millimeter of tracer displacement per millimeter of percolated water) were computed using the cumulated matrix water flow at the maximum of the elution peak (Table VI-4). Because, for many replicates at both 15cm and 30cm depth, no elution peak could be identified (either $\delta^{44}\text{Ca}$ values were below detection limit or the highest $\delta^{44}\text{Ca}$ values were at the end of the study period), maximum velocities were computed.

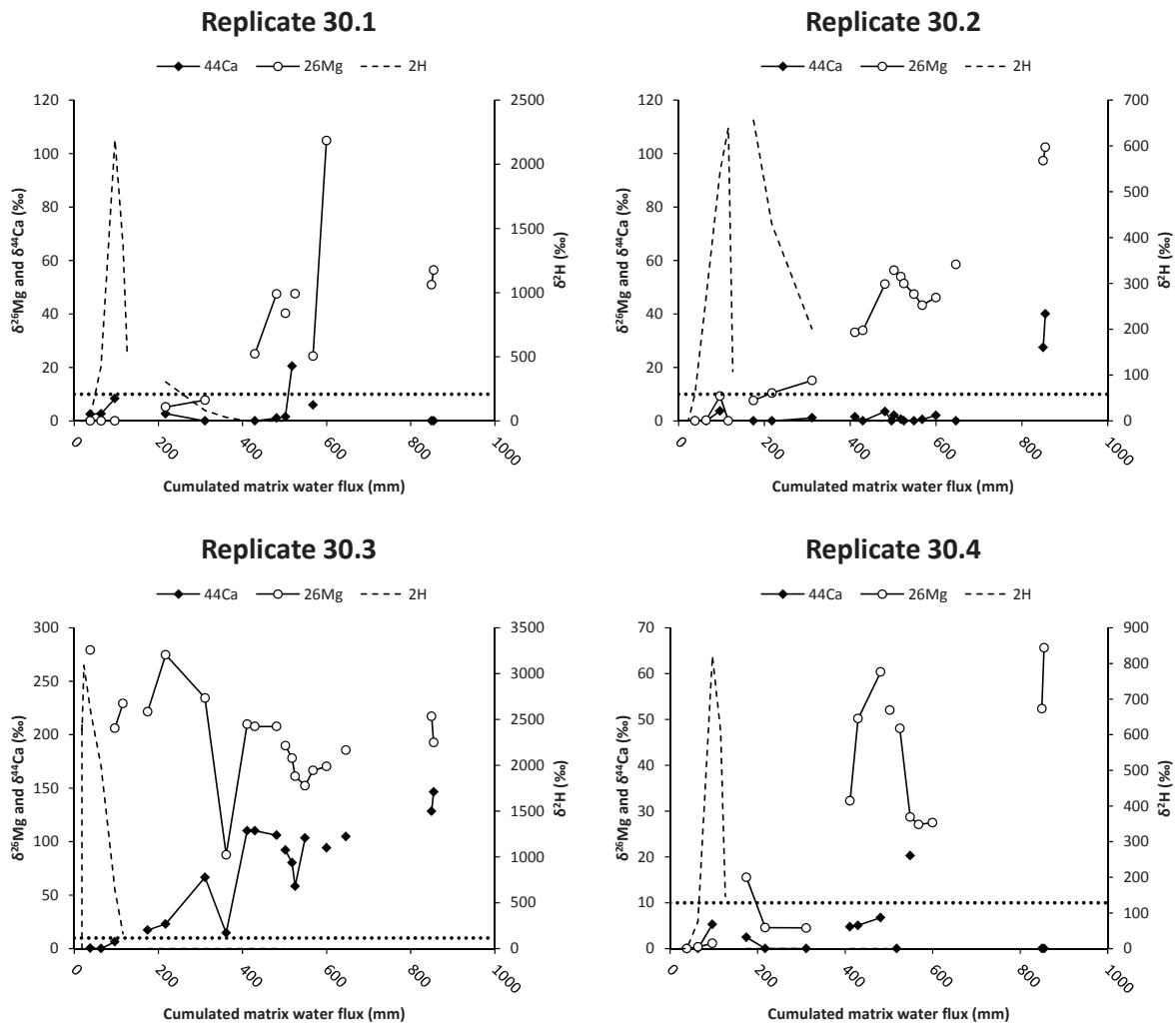


Figure VI-6 : Isotopic composition ($\delta^{26}\text{Mg}$, $\delta^{44}\text{Ca}$ and $\delta^2\text{H}$) of soil solution collected with tension-cup lysimeters at 30 cm depth plotted against cumulated matrix water flow since the application of tracers (van der Heijden et al., accepted Geoderma). The horizontal dotted line represents the analytical detection limit for excess ^{26}Mg and ^{44}Ca (10‰) (van der Heijden et al., accepted Plant and Soil). Correspondence between sampling dates and cumulated matrix water flow is given in Table VI-3.

3.4. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer fluxes in the soil profile

Cumulated ^{26}Mg and ^{44}Ca fluxes over the two years after the tracing experiment from the litter-layer and in the soil profile were compared to ^{26}Mg and ^{44}Ca pools in the soil profile in March 2012 (Figure VI-7). Both ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers were mainly retained in the superficial soil layers (0-15cm) ($\sim 58\%$ and $\sim 46.7\%$ respectively) and in the litter-layer ($\sim 8\%$ and $\sim 33\%$). The preferential flow component of the ^{26}Mg leaching flux at 10cm represented $\sim 11\%$ of the applied ^{26}Mg when ^{26}Mg in the soil below 10cm depth represented $\sim 15\%$ ($5.4\%+6.3\%+3.8\%$). The matrix flow components of the ^{26}Mg leaching flux at 15 and 30cm were also lower than ^{26}Mg in the soil below both depths. At 10cm depth, the preferential flow component of the ^{44}Ca leaching flux represented $\sim 8\%$ of applied ^{44}Ca which was higher than ^{44}Ca in the soil below 10cm depth ($\sim 1.4\%$). The matrix flow components of the ^{44}Ca leaching flux at 15 and 30cm depth were very low ($<1\%$) and no matrix flow leaching of ^{26}Mg and ^{44}Ca was evidenced at 60cm.

4. Discussion

4.1. Retention and release of ^{26}Mg and ^{44}Ca from the litter-layer

4.1.1. High retention of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the OL-layer of the litter layer

Organic matter through its' cationic exchange capacity plays an important role in the retention of base cations (Helling et al., 1964; Thompson et al., 1989; Ross et al., 1991; Turpault et al., 1996; Johnson, 2002). The cationic exchange capacity of organic matter is commonly associated with fine fractions of organic matter (OF and OH layers in the litter-layer or soil organic matter) and with the presence of carboxyl groups. In the beech plot, the litter layer is mainly composed of an OL-layer; OF-layer is very thin and discontinuous, due to heavy swathing before the plantation in 1975. The results from the *in situ* multi-isotopic tracing experiment show that coarse organic matter (OL layer) rapidly retains Mg and Ca inputs to the soil via rainfall or throughfall (Figure VI-1). We may thus suppose that the OL layer in our plot has an important cationic exchange capacity.

4.1.2. Slow release of ^{26}Mg and ^{44}Ca from the litter-layer

The pool of immobilized tracers in the litter-layer decreased during the two years after the tracing experiment: in March 2012 $8.0\pm 3.0\%$ of ^{26}Mg and $32.8\pm 8.6\%$ of ^{44}Ca were still retained in the litter-layer (Figure VI-1). As tracers were mainly retained on the cationic exchange capacity of the litter-layer, ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers may have been released by two different mechanisms: (1) organic matter mineralization or (2) ion exchange with throughfall cations.

One week after the tracing experiment, most of ^{26}Mg initially retained in the litter-layer was released (Figure VI-1) while almost 100% of applied ^{44}Ca was retained in the litter-layer during the first year after the tracing experiment. The different release dynamics may be explained by a much higher affinity of Ca for organic CEC than Mg. This has been reported by many studies (Salmon, 1964; André and Pijarowski, 1977; Baes and Bloom, 1988; Ponette et al., 1997; Curtin et al., 1998; DeSutter et al., 2006). Whereas Ca ions form strong complexes with some organic functional groups, Mg ions mainly bind through electrostatic bonds (Sentenac and Grignon, 1981). However, it is likely that a large proportion of Mg was not retained on the organic CEC of the litter layer. Indeed, only $80\pm 19\%$ of applied ^{26}Mg was retained in the litter layer after the 16 mm simulated rainfall event (deionised water) and only $31\pm 12\%$ remained one weeks after the tracing experiment (18.7 of cumulated rainfall since the application of tracers). Thereon, ^{26}Mg and ^{44}Ca trends in the litter-layer suggested that (1) retained Mg was mainly released by ion exchange processes with throughfall cations and (2) retained Ca was mainly released by organic matter mineralization processes (decomposition of exchange sites).

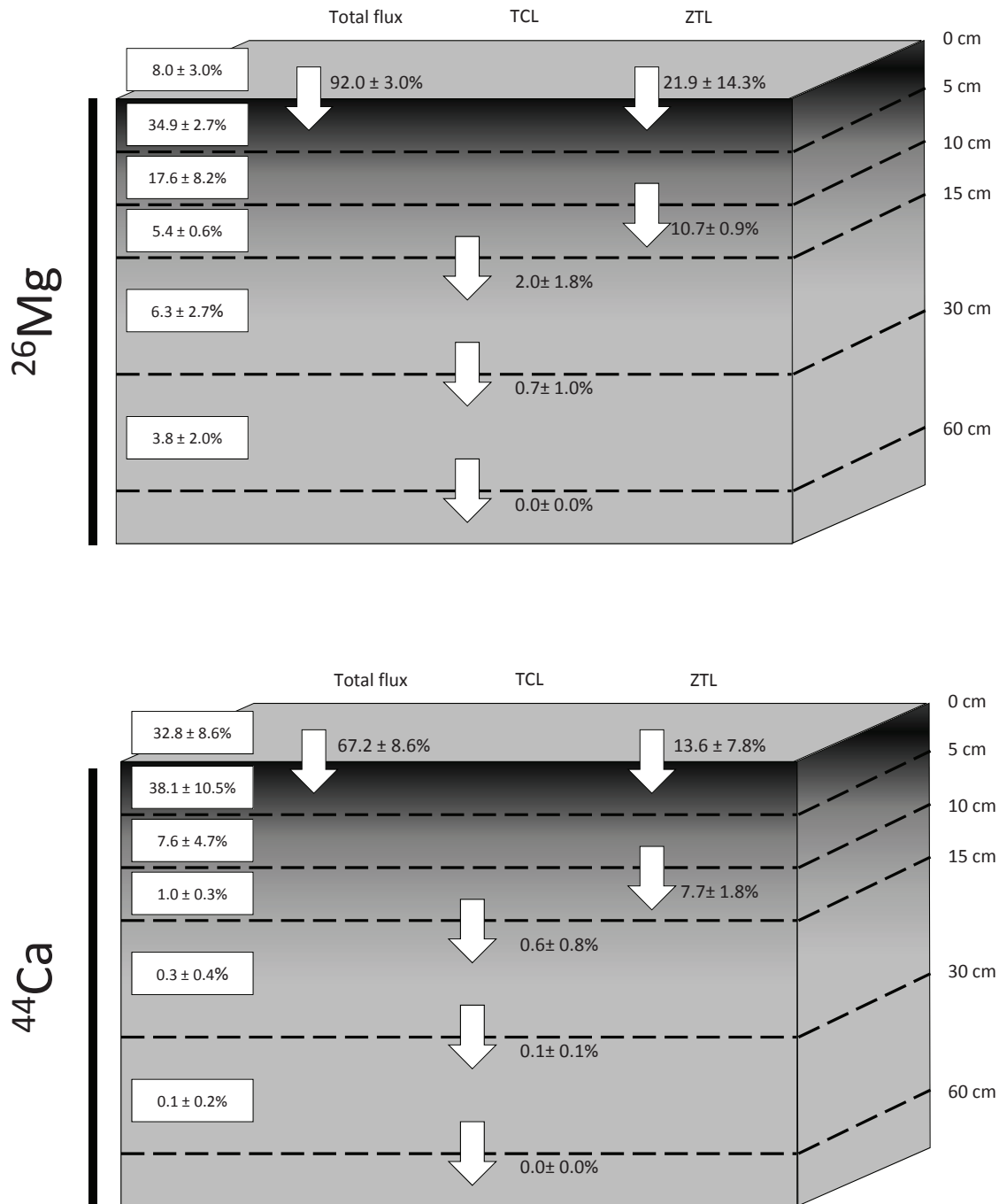


Figure VI-7: Summary of excess ^{26}Mg and ^{44}Ca pools in the organic and soil layers two years after the tracing experiment and calculated cumulated fluxes of excess ^{26}Mg and ^{44}Ca in the soil profile over the two years after the tracing experiment.

4.2. Vertical transfer of Mg and Ca from the topsoil to deeper soil horizons

4.2.1. The soil is a chromatographic column

The results from the tracing experiment are evidence that the elution of base cations in soils follows a chromatographic model. Mg was more mobile in the soil profile and transferred to deeper soil horizons. This was evidenced by the monitoring of the isotopic composition of soil

CEC and soil solutions. Significant ^{26}Mg amounts were observed below 15 cm depth as soon as November 2011 (Figure VI-2), whereas very little ^{44}Ca (~1%) was found below 15cm after two years (Figure VI-3). This was reflected by the mapping of tracers in the soil profile in March 2012: ~33% of ^{26}Mg and only ~9% of ^{44}Ca was found below 5cm depth, ~15% of ^{26}Mg was found below 15cm depth. The difference of vertical transfer velocities (Table VI-4) of Mg and Ca was also evidenced by the monitoring of the isotopic composition of soil solutions at 15cm and 30 cm depth (Figure VI-5 and Figure VI-6). At 15 cm and 30 cm depth, $\delta^{26}\text{Mg}$ was systematically higher than $\delta^{44}\text{Ca}$ and ^{26}Mg elution peaks occurred before ^{44}Ca in many cases. Some TCL replicates showed no or very small $\delta^{44}\text{Ca}$ throughout the study period.

	Selectivity coefficient (Ca-Mg)
Robbins et al., 1980	
Penoyer loam	1.45
Hunting silty clay loam	1.72
Clark, 1970	
Wyoming bentonite	0.94
Krishnamoorthy and Overstreet, 1950	
Utah bentonite	1.08
Yolo clay	1.42
Paul et al., 1966	
Oakley soil	1.56
Hanford soil	1.85
Arbuckle soil	1.69
Yolo soil	1.49
Sacramento soil	1.51
Salmon, 1964	
Wyoming bentonite	1.22
Elisworth illite	1.22
Peat	5.0
Udo, 1978	
Kaolinitic clay	1.47-1.56
Suarez and Zahow, 1989	
Montmorillonite soil	1.12
Sposito and Fletcher, 1985	
Montmorillonite soil	1.18
Gaston et al., 1993	
Smectitic soils	~1.0
Momii et al., 1997	
Farmland loamy sand (Aeric Haplaquent)	1.55

Table VI-5: Calcium-Magnesium selectivity coefficients in different soils

Johnson et al. (1995; 2000) observed a similar chromatographic effect during a Mg and Ca leaching event induced by a pulse of NO_3 : both cations peaked simultaneously in the surface soil horizons but separated with depth. Many studies have used chromatographic models to simulate Mg and Ca reactive transport in soil columns (Mansell et al., 1988; Mansell et al., 1993). In such models, the separation of Mg and Ca elution peaks is governed by the selectivity coefficients of the cationic exchange capacity ($K_{\text{Ca-Mg}}$). $K_{\text{Ca-Mg}}$ was not measured for the soil profile of the tracing plot. However, $K_{\text{Ca-Mg}}$ have been measured in many different soil types (Table VI-5) and generally range between 1 and 1.5 indicating a higher affinity of the cationic exchange capacity for Ca.

Sposito and Fletcher (1985), observed $K_{\text{Ca-Mg}}$ above 1 for a montmorillonitic soil. Authors argued that Ca-Mg selectivity coefficients of the mineral component of the cationic exchange capacity was likely to be close to 1 (Sposito et al., 1983) and that observed $K_{\text{Ca-Mg}}$ in soil samples was probably due to the organic component of the cationic exchange capacity (Fletcher et al., 1984). Indeed, affinity of the organic cationic exchange capacity for Ca is much higher than for Mg (André and Pijarowski, 1977; Baes and Bloom, 1988; Ponette et al., 1997; Curtin et al., 1998;

DeSutter et al., 2006). For instance, Salmon (1964) measured $K_{Ca-Mg}=5$ in a peat soil (Table VI-5). Given that most selectivity coefficients presented in Table VI-5 were measured for agricultural soils with low carbon content, that carbon content is higher in forest soils and at the tracing plot soil in particular (Table VI-1), it is likely that Ca-Mg selectivity coefficients of the soil in the tracing plot were much higher. Indeed, the soil CEC seems to be mainly composed of organic CEC (Table VI-1). Our results were in agreement with reported proportions of organic CEC in forest ecosystems: 49% (Thompson et al., 1989), 75-85% (Oorts et al., 2003), 85% (Turpault et al., 1996). We hypothesize that soil organic matter and its cationic exchange capacity governed the different Mg and Ca dynamics observed in the soil profile during the multi-isotopic tracing experiment.

4.2.2. Evidence of rapid and slow transfer of Mg and Ca tracers

The monitoring of soil solutions evidenced different types of Mg and Ca transport in the soil (Figure VI-5 and Figure VI-6). The different types of transport observed may be explained by the type of water flow (preferential and matrix flow) and the relative contribution of mineral and soil organic matter to soil CEC. The spatial variability of the different transport types was very high (Figure VI-5) and may be explained by the very high spatial variability of soil physical (soil total porosity, pore size distribution...) and chemical properties (soil organic matter content, mineral distribution...). We summarize hereafter the different types of Mg and Ca transport observed:

(1) Rapid transfer with preferential water flow

- i. **Mineral Pipe flow:** ^{26}Mg and ^{44}Ca are rapidly transferred through the soil with preferential water flow but interact with the soil CEC which is mainly composed of mineral CEC. The transport of Mg and Ca may thus be delayed compared to the water flux but Mg and Ca elution peaks are not separated ($K_{Ca-Mg} \approx 1$). This type of flow was illustrated by TCL Replicate 15.3.

$$H_2O \geq Mg \approx Ca$$

- ii. **Organic Pipe flow:** ^{26}Mg and ^{44}Ca are rapidly transferred through the soil with preferential water flow but interact with the soil CEC which is mainly composed of organic CEC. Mg and Ca elution peaks are delayed compared to water due to interaction with the organic CEC which causes the separation of Mg and Ca elution peaks ($K_{Ca-Mg} \gg 1$). This type of flow was illustrated by TCL Replicate 15.4 and 30.3.

$$H_2O \geq Mg > Ca$$

(2) Slow transfer in matrix water flow

- i. **Mineral Matrix flow** ^{26}Mg and ^{44}Ca are slowly transferred through the soil with matrix water flow and interact with the soil CEC which is mainly composed of mineral CEC. Mg and Ca are thus delayed compared to the water flux but Mg and Ca elution peaks are not separated ($K_{Ca-Mg} \approx 1$).

$$H_2O \gg Mg \approx Ca$$

- ii. **Organic Matrix flow** ^{26}Mg and ^{44}Ca are slowly transferred through the soil with matrix water flow and interact with the soil CEC which is mainly composed of organic CEC. Mg and Ca are thus delayed compared to the water flux and the Ca elution peak is delayed compared to Mg ($K_{Ca-Mg} \gg 1$).

$$H_2O \gg Mg \gg Ca$$

4.4. Influence on the nutrient leaching flux

The deuterium water tracing experiment showed that preferential water flow had a strong influence on the deuterium drainage flux (van der Heijden et al., accepted Geoderma). In this previous study, the chemical composition of preferential water flow was estimated from soil solution collected with ZTL at 10cm depth. Preferential water flow may also strongly increase nutrient leaching from the soil profile. However, there was previously no evidence to support the assumption that the chemical composition of preferential water flow does not change with depth.

Throughout the study period, no enrichment above the detection limit was observed in TCL at 60 cm depth (data not shown). The matrix flow component of the ^{26}Mg and ^{44}Ca leaching flux was thus nil. The computed preferential flow component of the tracer leaching flux represented 10.7% of applied ^{26}Mg and 7.7% of ^{44}Ca . However, there is evidence that the isotopic composition of preferential water flow changed with depth.

- (1) No relation was found between $\delta^{26}\text{Mg}$ or $\delta^{44}\text{Ca}$ ZTL at 0 cm and 10 cm depth.
- (2) Isotope enrichments were lower at 10cm depth than at 0cm for both Mg and Ca (Figure VI-4).
- (3) The ^{26}Mg and ^{44}Ca preferential flux was lower at 10cm (10.7% of applied ^{26}Mg and 7.7% of applied ^{44}Ca) than at 0 cm (21.9% and 13.6% respectively) (Figure VI-7).
- (4) For TCL in which preferential water flow was evidenced, ^{26}Mg and ^{44}Ca elution peaks did not always occur simultaneously. For instance, in replicate 15.4 and in replicate 30.3, a ^{26}Mg elution peak associated to preferential water flow occurred but no such peak occurred for ^{44}Ca .
- (5) Tracer recovery two years after the tracing experiment ($102.0\pm 11.3\%$ for ^{26}Mg and $100.2\pm 18\%$ for ^{44}Ca) suggests that no leaching of tracers occurred (van der Heijden et al., submitted Ecosystems)

Although preferential flow is an important hydrological process that may strongly influence nutrient dynamics and distribution in the soil profile, our results do not support the hypothesis that Mg and Ca are leached with preferential water flow (van der Heijden et al., accepted Geoderma). The chemical composition change of preferential water flow with depth may be explained by root uptake along preferential flow paths (Bramley et al., 2003) (Martinez-Meza and Whitford, 1996) and/or reactive transport of cations along preferential flow paths. However, the separation of ^{26}Mg and ^{44}Ca elution peaks along preferential water flow paths suggests that the main process is reactive transport of cations along preferential flow paths. Whatever the type of transfer (slow or rapid), Mg and Ca was retained by the soil solid phase.

5. Conclusion

Organic matter in the litter-layer and in the soil profile played an essential role in the incorporation of rainfall Mg and Ca inputs into the biogeochemical cycling of these nutrients within the forest ecosystem. The litter-layer, although very thin, very rapidly immobilized Mg and Ca inputs and progressively released these nutrients during the two first years after the tracing experiment. The litter-layer was also proven to be an important source of Mg and Ca for plant uptake. The vertical transfer of released tracers from the litter-layer was strongly influenced by preferential water flow which caused preferential leaching of Mg and Ca to deeper soil horizons. However, preferential water flow did not cause tracer losses from the ecosystem. Most of released tracers were accumulated in the topsoil (0-5 cm layer). The dynamics of both nutrients differed: Mg was more mobile than Ca (faster release from the litter-layer and faster transfer to deep soil layers). We hypothesized that the cationic exchange capacity of the soil was dominated by organic CEC to explain such differences.

Organic matter in the litter-layer and soil organic matter play an essential role in the biogeochemical cycling of Mg and Ca and thus soil fertility, by rapidly immobilizing Mg and Ca inputs and thus limiting ecosystem losses for these nutrients. Silvicultural practices that affect carbon cycling in soils, such as whole tree harvesting or clear felling, may thus strongly impact soil fertility in forest ecosystems on base poor soils where the soil total CEC is mainly dominated by organic CEC. By decreasing carbon pools in the soil profile, the soil total CEC may rapidly decrease followed by plant available base cations.

6. Reference list

- André, J.P., Pijarowski, L., 1977. Cation exchange properties of sphagnum peat: exchange between two cations and protons. *Journal of Soil Science* 28, 573-584.
- Attiwill, P.M., 1968. The Loss of Elements from Decomposing Litter. *Ecology* 49, 142-145.
- Baes, A.U., Bloom, P.R., 1988. Exchange of Alkaline Earth Cations in Soil Organic Matter. *Soil Science* 146, 6-14.
- Bailey, S.W., Horsley, S.B., Long, R.P., 2005. Thirty Years Of Change In Forest Soils Of The Allegheny Plateau, Pennsylvania. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 681-690.
- Binkley, D., 2002. Ten-year decomposition in a loblolly pine forest. *Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For.* 32, 2231-2235.
- Blair, J.M., 1988. Nutrient release from decomposing foliar litter of 3 tree species with special reference to calcium, magnesium and potassium dynamics. *Plant Soil* 110, 49-55.
- Bockheim, J.G., Jepsen, E.A., Heisey, D.M., 1991. Nutrient dynamics in decomposing leaf litter of 4 tree species on a sandy soil in northwestern Wisconsin. *Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For.* 21, 803-812.
- Bramley, H., Hutson, J., Tyerman, S.D., 2003. Floodwater infiltration through root channels on a sodic clay floodplain and the influence of a local tree species *Eucalyptus largiflorens*. *Plant Soil* 253, 275-286.
- Clark, J.S., 1970. Distribution constant for exchange of calcium and manganese in Wyoming bentonite. *Canadian Journal of Soil Science* 50, 85-86.
- Curtin, D., Selles, F., Steppuhn, H., 1998. Estimating Calcium-Magnesium Selectivity in Smectitic Soils from Organic Matter and Texture. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 1280-1285.
- Dambrine, E., Pollier, B., Poszwa, A., Ranger, J., Probst, A., Viville, D., Biron, P., Granier, A., 1998. Evidence of current soil acidification in spruce stands in the Vosges Mountains, north-eastern France. *Water Air Soil Pollut.* 105, 43-52.
- Das Gupta, S., DeLuca, T.H., 2012. Short-term changes in belowground C, N stocks in recently clear felled Sitka spruce plantations on podzolic soils of North Wales. *Forest Ecol Manag* 281, 48-58.
- DeSutter, T.M., Pierzynski, G.M., Baker, L.R., 2006. Flow-through and batch methods for determining calcium-magnesium and magnesium-calcium selectivity. *Soil Sci Soc Am J* 70, 550-554.
- Dijkstra, F.A., 2003. Calcium mineralization in the forest floor and surface soil beneath different tree species in the northeastern US. *Forest Ecol Manag* 175, 185-194.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and ecology of earthworms*. Chapman and Hall Ltd, London, UK.
- Ericsson, K., 2004. Bioenergy policy and market development in Finland and Sweden. *Energy policy* 32, 1707-1721.
- Evans, L.J., 1982. Cation exchange capacities and surface areas of humic gleysolic Ap horizons from southwestern Ontario. *Canadian journal of soil science.* 62, 291-296.
- Fletcher, P., Sposito, G., Levesque, C.S., 1984. Sodium- calcium-magnesium exchange reactions on a montmorillonitic soil. 1. Binary exchange reactions. *Soil Sci Soc Am J* 48, 1016-1021.
- Galy, A., Yoffe, O., Janney, P.E., Williams, R.W., Cloquet, C., Alard, O., Halicz, L., Wadhwa, M., Hutcheon, I.D., Ramon, E., Carignan, J., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM980 and new reference materials for magnesium-isotope-ratio measurements. *J Anal Atom Spectrom* 18, 1352-1356.
- Gaston, L.A., Selim, H.M., Walthall, P.M., 1993. Predicting cation transport in smectitic soils. *Soil Sci Soc Am J* 57, 307-310.
- Gosz, J.R., Likens, G.E., Bormann, F.H., 1973. Nutrient Release From Decomposing Leaf and Branch Litter in the Hubbard Brook Forest, New Hampshire. *Ecological Monographs* 43, 173-191.
- Granier, A., Badeau, V., Bréda, N., 1995. Modélisation du bilan hydrique des peuplements forestiers. *Revue Forestière Française XLVN* Special issue, 59-67.
- Granier, A., Bréda, N., Biron, P., Villette, S., 1999. A lumped water balance model to evaluate duration and intensity of drought constraints in forest stands. *Ecol Model* 116, 269-283.
- Hansen, K., Vesterdal, L., Schmidt, I.K., Gundersen, P., Sevel, L., Bastrup-Birk, A., Pedersen, L.B., Bille-Hansen, J., 2009. Litterfall and nutrient return in five tree species in a common garden experiment. *Forest Ecol Manag* 257, 2133-2144.
- Hansson, K., Olsson, B.A., Olsson, M., Johansson, U., Kleja, D.B., 2011. Differences in soil properties in adjacent stands of Scots pine, Norway spruce and silver birch in SW Sweden. *Forest Ecol Manag* 262, 522-530.

- Helling, C.S., Chesters, G., Corey, R.B., 1964. Contribution of Organic Matter and Clay to Soil Cation-Exchange Capacity as Affected by the pH of the Saturating Solution¹. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 28, 517-520.
- Hoefs, J., 2009. *Stable Isotope Geochemistry*, 6th Edition. Springer-Verlag, Germany.
- Johnson, C.E., 2002. Cation exchange properties of acid forest soils of the northeastern USA. *Eur J Soil Sci* 53, 271-282.
- Johnson, C.E., Johnson, A.H., Huntington, T.G., Siccama, T.G., 1991. Whole-tree clear-cutting effects on soil horizons and organic-matter pools. *Soil Sci Soc Am J* 55, 497-502.
- Johnson, D.W., 1995. Temporal patterns in beech forest soil solutions - Field and model results compared. *Soil Sci Soc Am J* 59, 1732-1740.
- Johnson, D.W., Curtis, P.S., 2001. Effects of forest management on soil C and N storage: meta analysis. *Forest Ecol Manag* 140, 227-238.
- Johnson, D.W., Sogn, T., kvindesland, S., 2000. The Nutrient Cycling model: lessons learned. *Forest Ecol Manag* 138, 91-106.
- Johnson, D.W., Todd, D.E., Jr., Trettin, C.F., Mulholland, P.J., 2008. Decadal Changes in Potassium, Calcium, and Magnesium in a Deciduous Forest Soil. *Soil Sci Soc Am J* 72, 1795-1805.
- Krishnamoorthy, C., Overstreet, R., 1950. An Experimental Evaluation of Ion-Exchange Relationships. *Soil Science* 69, 41-54.
- Likens, G.E., Driscoll, C.T., Buso, D.C., 1996. Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. *Science* 272, 244-246.
- Likens, G.E., Driscoll, C.T., Buso, D.C., Siccama, T.G., Johnson, C.E., Lovett, G.M., Fahey, T.J., Reiners, W.A., Ryan, D.F., Martin, C.W., Bailey, S.W., 1998. The biogeochemistry of calcium at Hubbard Brook. *Biogeochemistry* 41, 89-173.
- Mansell, R.S., Bloom, S.A., Selim, H.M., Rhue, R.D., 1988. Simulated transport of multiple cations in soil using variable selectivity coefficients. *Soil Sci Soc Am J* 52, 1533-1540.
- Mansell, R.S., Bond, W.J., Bloom, S.A., 1993. Simulating cation transport during water flow in soil - 2. Approaches. *Soil Sci Soc Am J* 57, 3-9.
- Mareschal, L., 2008. Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur minéralogie : bilan après 28 ans dans le site expérimental de Breuil (Morvan). *Ressources Procédés Produits Environnement*. Université Henri Poincaré, Nancy, p. 328.
- Marschner, H., 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic, London.
- Martinez-Meza, E., Whitford, W.G., 1996. Stemflow, throughfall and channelization of stemflow by roots in three Chihuahuan desert shrubs. *Journal of Arid Environments* 32, 271-287.
- Miller, H.G., Cooper, J.M., Miller, J.D., Pauline, O.J.L., 1979. Nutrient cycles in pine and their adaptation to poor soils. *Can. J. For. Res. - Rev. Can. Rech. For.* 9, 19-26.
- Momii, K., Hiroshiro, Y., Jinno, K., Berndtsson, R., 1997. Reactive solute transport with a variable selectivity coefficient in an undisturbed soil column. *Soil Sci Soc Am J* 61, 1539-1546.
- Moukouri, J., 2006. Effet des essences forestières sur la biodégradation des matières organiques : impacts sur la dynamique et le cycle du carbone, de l'azote et des éléments minéraux. Université Henri Poincaré, Nancy, p. 255.
- Olsson, B.A., Bengtsson, J., Lundkvist, H., 1996. Effects of different forest harvest intensities on the pools of exchangeable cations in coniferous forest soils. *Forest Ecol Manag* 84, 135-147.
- Oorts, K., Vanlauwe, B., Merckx, R., 2003. Cation exchange capacities of soil organic matter fractions in a Ferric Lixisol with different organic matter inputs. *Agriculture Ecosystems & Environment* 100, 161-171.
- Osono, T., Takeda, H., 2004. Potassium, calcium, and magnesium dynamics during litter decomposition in a cool temperate forest. *J. For. Res.* 9, 23-31.
- Paul, J.L., Tanji, K.K., Anderson, W.D., 1966. Estimating Soil and Saturation Extract Composition by a Computer Method¹. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 30, 15-17.
- Pedersen, L.B., Bille-Hansen, J., 1999. A comparison of litterfall and element fluxes in even aged Norway spruce, sitka spruce and beech stands in Denmark. *Forest Ecol Manag* 114, 55-70.
- Ponette, Q., Dufey, J.E., Weissen, F., 1997. Downward movement of dolomite, kieserite or a mixture of CaCO₃ and kieserite through the upper layers of an acid forest soil. *Water Air Soil Pollut.* 95, 353-379.
- Pratt, P.F., 1961. Effect of pH on the Cation-Exchange Capacity of Surface Soils¹. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 25, 96-98.

- Puech, J., 2009. Mise en valeur de la forêt française et développement de la filière bois. Paris, p. 75.
- Ranger, J., Andreux, F., Bienaimé, S., Berthelin, J., Bonnaud, P., Boudot, J.P., Bréchet C, Buée, M., Calmet, J., Chaussod, R., Gelhaye, D., Gelhaye, L., Gérard, F., Jaffrain, J., Lejon, D., Le Tacon, F., Lévêque, J., Maurice, J., Merlet, D., Moukoui, J., Munier-Lamy, C., Nourrisson, G., Pollier, B., Ranjard, L., Simonsson, M., Turpault, M.P., Vairielles, D., Zeller, B., 2004. Effet des substitutions d'essence sur le fonctionnement organo-minéral de l'écosystème forestier, sur les communautés microbiennes et sur la diversité des communautés fongiques mycorrhiziennes et saprophytes (cas du dispositif de Breuil - Morvan), Rapport final contrat INRA-GIP Ecofor 2001-24, No. INRA 1502A. INRA Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (UR 1138), 54280 Champenoux.
- Ranger, J., Marques, R., ColinBelgrand, M., 1997. Nutrient dynamics during the development of a Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb) stand. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* 18, 73-90.
- Robbins, C.W., Jurinak, J.J., Wagenet, R.J., 1980. Calculating cation-exchange in a salt transport model. *Soil Sci Soc Am J* 44, 1195-1200.
- Ross, D.S., Bartlett, R.J., Magdoff, F.R., 1991. Exchangeable cations and the pH-independent distribution of cation exchange capacities in Spodosols of a forested watershed.
- Salmon, R.C., 1964. Cation exchange reactions. *Journal of Soil Science* 15, 273-283.
- Sentenac, H., Grignon, C., 1981. A model for predicting ionic equilibrium concentrations in cell-walls. *Plant physiology* 68, 415-419.
- Sposito, G., Fletcher, P., 1985. Sodium calcium magnesium exchange-reactions on a montmorillonitic soil. 3. Calcium-magnesium exchange selectivity. *Soil Sci Soc Am J* 49, 1160-1163.
- Sposito, G., Holtzclaw, K.M., Jouany, C., Charlet, L., 1983. Cation selectivity in sodium - calcium, sodium - magnesium, and calcium - magnesium exchange on Wyoming bentonite at 298-K. *Soil Sci Soc Am J* 47, 917-921.
- Stevens, P.A., Hornung, M., Hughes, S., 1989. Solute concentrations, fluxes and major nutrient cycles in a mature sitka-spruce plantation in Beddgelert forest, North Whales. *Forest Ecol Manag* 27, 1-20.
- Suarez, D.L., Zahow, M.F., 1989. Calcium-magnesium exchange selectivity of Wyoming montmorillonite in chloride, sulphate and perchlorate solutions. *Soil Sci Soc Am J* 53, 52-57.
- Thimonier, A., Dupouey, J.L., Le Tacon, F., 2000. Recent losses of base cations from soils of *Fagus sylvatica* L. stands in northeastern France. *Ambio* 29, 314-321.
- Thompson, M.L., Zhang, H., Kazemi, M., Sandor, J.A., 1989. Contribution of organic-matter to cation exchange capacity and specific surface area of fractionated soil materials. *Soil Science* 148, 250-257.
- Turpault, M.P., Bonnaud, P., Fichter, J., Ranger, J., Dambrine, E., 1996. Distribution of cation exchange capacity between organic matter and mineral fractions in acid forest soils (Vosges mountains, France). *Eur J Soil Sci* 47, 545-556.
- Udo, E.J., 1978. Thermodynamics of Potassium-Calcium and Magnesium-Calcium Exchange Reactions on a Kaolinitic Soil Clay1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 556-560.
- van der Heijden, G., Legout, A., Midwood, A.J., Craig, C.A., Pollier, B., Ranger, J., Dambrine, E., accepted Plant and Soil. Mg and Ca root uptake and vertical transfer in soils assessed by an in situ ecosystemscale multi-isotopic (^{26}Mg & ^{44}Ca) tracing experiment in a beech stand (Breuil-Chenué, France). *Plant Soil*.
- van der Heijden, G., Legout, A., Nicolas, M., Ulrich, E., Johnson, D.W., Dambrine, E., 2011. Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change. *Forest Ecol Manag* 261, 730-740.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Bréchet, C., Ranger, J., Dambrine, E., accepted Geoderma. Tracing and modeling preferential water flow through a forest soil – potential impact on nutrient leaching. *Geoderma*.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Ranger, J., Dambrine, E., submitted Ecosystems. Calcium and magnesium nutrient budgets tested with the isotope dilution technique (^{26}Mg and ^{44}Ca) Ecosystems.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Turpault, M.P., Ranger, J., Dambrine, E., accepted FEM. Sustainability of broadleaved forest nutrition facing reduced atmospheric deposition - A case study in the Morvan Mountains. *Forest Ecol Manag*.
- van Wesemael, B., 1993. Litter decomposition and nutrient distribution in humus profiles in some mediterranean forests in southern Tuscany. *Forest Ecol Manag* 57, 99-114.
- Wilding, L.P., Rutledge, E.M., 1966. Cation-Exchange Capacity as a Function of Organic Matter, Total Clay, and Various Clay Fractions in a Soil Toposequence1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 30, 782-785.
- Wright, W.R., Foss, J.E., 1972. Contributions of Clay and Organic Matter to the Cation Exchange Capacity of Maryland Soils1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 36, 115-118.
- Yuan, T.L., Gammo, N., Leighty, R.G., 1967. Relative Contribution of Organic and Clay Fractions to Cation-Exchange Capacity of Sandy Soils From Several Soil Groups. *Soil Science* 104, 123-128.

VII

Chapitre VII – Prélèvement et allocation des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans la biomasse aérienne des arbres

Les résultats présentés dans le chapitre VI ont mis en évidence des transferts lents de magnésium et de calcium entre les différents pools échangeables du sol. La signature isotopique des différents pools du profil de sol sont donc assez distincts pour envisager d'appliquer un modèle de mélange afin d'estimer les sources de magnésium et de calcium dans le profil de sol. D'autre part, les résultats présentés dans le chapitre V montrent une incorporation des traceurs dans les racines fines. L'objectif de ce chapitre est de cartographier le prélèvement de magnésium et de calcium dans le profil de sol et étudier la translocation du magnésium et du calcium des racines vers la canopée

I. Résumé de l'étude

I.1. Introduction

Pour expliquer certaines incohérences entre les bilans de flux « entrées-sorties » et les évolutions mesurées des réserves échangeables du sol, certains auteurs ont émis l'hypothèse que les arbres ont accès à une ou plusieurs sources de nutriments externes ou internes à l'écosystème qui ne sont pas actuellement prises en compte par les approches conventionnelles (Johnson and Todd, 1998; Bailey *et al.*, 2003; Jandl *et al.*, 2004; Grigal and Ohmann, 2005; Yanai *et al.*, 2005).

En prélevant le magnésium et le calcium dans les horizons profonds, les arbres augmenteraient les stocks échangeables de ces nutriments dans les horizons de surface (cycle biologique) et limiteraient les pertes à l'écosystème par drainage (Nowak *et al.*, 1991; Fisher, 1995; Dijkstra and Smits, 2002; Brandtberg *et al.*, 2004). Ce concept a été nommé « base-pump effect » (Vejre and Hoppe, 1998). Le calcium et le magnésium pourraient aussi être directement absorbés par les feuilles (Bukovac and Wittwer, 1957; Wittwer and Teubner, 1959; Schimansky, 1988; Chishaki *et al.*, 2007). La remobilisation de Mg et de Ca stockés dans les tissus ligneux pourrait aussi contribuer à la croissance de nouveaux organes (Proe *et al.*, 2000; Weatherall *et al.*, 2006).

Augusto *et al.* (2011) ont injecté des traceurs isotopiques (^{15}N , ^{26}Mg et ^{42}Ca) dans les troncs de jeunes plants (8 ans) de pin maritime. Cette expérience a mis en évidence une ascendance lente de magnésium et très lente de calcium dans le flux de sève brute. Cette expérience suggère que ces éléments ne migrent pas librement en solution dans la sève mais plutôt déplacent vers le haut un stock préalablement prélevé et stocké dans la colonne échangeuse d'ions constituée par le tronc. Ainsi les arbres pourraient compenser une faible disponibilité des nutriments dans le sol en mobilisant des proportions plus importantes de sources internes à la plante.

Les objectifs de ce chapitre sont d'exploiter le traçage isotopique pour (1) cartographier le prélèvement de magnésium et de calcium dans le profil de sol et (2) étudier les vitesses de translocation du magnésium et du calcium des racines vers la canopée.

I.2. Principaux résultats

I.2.1. Cartographie du prélèvement de magnésium et de calcium dans le profil de sol

Le prélèvement de ^{26}Mg et de ^{44}Ca a été mesuré à partir des arbres échantillonnés en février 2012 lors d'une éclaircie (Chapitre VIII). Le prélèvement de ^{26}Mg et de ^{44}Ca dans le sol a été modélisé de deux manières différentes : (1) à partir du flux de transpiration couplé aux concentrations en ^{26}Mg et en ^{44}Ca dans les solutions du sol (prélèvement par flux de masse d'eau) et (2) à partir du prélèvement total estimé de Mg et Ca et des concentrations en ^{26}Mg et en ^{44}Ca dans les pools échangeables du sol.

L'hypothèse d'un prélèvement couplé passivement de Ca et Mg et d'eau (1) n'a pas permis de reproduire le prélèvement des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca mesuré et cela quelle que soit la profondeur (0cm, 10cm, 15cm, 30cm et 60cm) et le type (plaque lysimétrique ou bougie poreuse) de solutions de sol considérés. De plus, la comparaison des enrichissements isotopiques des solutions du sol aux différentes profondeurs et des flux de transpiration dans chaque couche de sol a permis de mettre en évidence un découplage du prélèvement d'eau et de nutriments dans le profil de sol.

La modélisation à partir du prélèvement total estimé de Mg et Ca et des concentrations en ^{26}Mg et en ^{44}Ca dans les pools échangeables du sol (2) a permis de calculer la distribution verticale du prélèvement de Mg et de Ca dans le sol, indépendamment du prélèvement d'eau. Les résultats ont mis en évidence l'importance de la couche de litière dans la nutrition des arbres : de 82% à 94% du magnésium et de 35% à 65% du calcium seraient prélevés directement dans cette couche de litière. Les résultats ont aussi mis en évidence des différences entre le prélèvement de magnésium et de calcium. La modélisation prédit un prélèvement de magnésium essentiellement dans les horizons superficiels du sol et un prélèvement mieux réparti dans le profil de sol pour le calcium. Cependant, vu la faible disponibilité du calcium en profondeur et en raison du faible flux fourni par l'altération minérale, une telle contribution des horizons profonds au prélèvement de calcium est peu probable. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer les résultats de modélisation du prélèvement de calcium :

- i. Le prélèvement total de calcium est surestimé (recyclage de calcium interne à l'arbre)
- ii. Une autre source de calcium de composition isotopique proche de l'abondance naturelle est prélevée (absorption foliaire)

I.2.2. Translocation du magnésium et du calcium des racines vers la canopée

Les traceurs isotopiques du magnésium et du calcium ont été rapidement absorbés par les racines fines. Le suivi des enrichissements isotopiques des feuilles met cependant en évidence une translocation lente du magnésium et du calcium des racines jusqu'à la canopée alors que la translocation du ^{15}N a été très rapide : les feuilles étaient enrichies en ^{15}N dès le mois suivant l'apport des traceurs, tandis que de très faibles enrichissements en ^{26}Mg et en ^{44}Ca n'ont été mesurés dans les branches qui composent la canopée qu'en 2012. La cartographie des traceurs isotopiques de Mg et de Ca dans les arbres en février 2012 montre qu'ils sont majoritairement concentrés dans les tissus à la base du tronc.

Ce décalage temporel est probablement lié à des processus différents de transport dans les vaisseaux du xylème. Les vaisseaux du xylème sont comparables à une colonne chromatographique. Leurs parois cellulaires développent une grande capacité d'échange cationique (Biddulph *et al.*, 1959; Biddulph *et al.*, 1961; Bell and Biddulph, 1963; Shear and Faust, 1970; Vandegheijn and Petit, 1979). Dans la sève brute l'azote se trouve sous forme organique ou sous forme de nitrate (Marschner, 1995). Ces formes chimiques sont soit électriquement neutres soit chargées négativement. Ainsi le flux d'azote dans la sève brute, une fois franchie la barrière radiculaire, est probablement véhiculé par le flux de transpiration d'eau (flux de masse) avec peu ou pas d'interaction avec les parois des vaisseaux du xylème.

Le calcium, ayant une plus forte affinité que le magnésium pour la capacité d'échange cationique de la matière organique (Salmon, 1964; André and Pijarowski, 1977; Baes and Bloom, 1988; Ponette *et al.*, 1997; Curtin *et al.*, 1998; DeSutter *et al.*, 2006), aurait été plus fortement retenu le long des vaisseaux du xylème. Une part du calcium a aussi pu précipiter sous forme d'oxalate de calcium (Nakata, 2003; Franceschi and Nakata, 2005). Vu les faibles vitesses de transfert, il semblerait que le principal processus soit l'échange d'ions de proche en proche. Le nouveau calcium et magnésium prélevé déplacerait ainsi le calcium et magnésium déjà présent sur l'échangeur, permettant ainsi l'ascension progressive de ces éléments dans les vaisseaux du xylème.

II. Tracing Mg and Ca uptake and allocation in a beech stand on base-poor soil with ^{26}Mg and ^{44}Ca

Gregory van der Heijden^{(1)*}, Arnaud Legout⁽¹⁾, Benoît Pollier⁽¹⁾, Jacques Ranger⁽¹⁾,
Etienne Dambrine⁽²⁾

Article en préparation

(1) INRA – UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes forestiers, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France

(2) INRA – UMR 042 CARTEL, Université de Savoie, Centre Interdisciplinaire Scientifique de la Montagne, Belledonne 226, 73376 Le Bourget-du-Lac Cedex

*Corresponding author

Tel : 03 83 39 73 27

Fax : 03 83 39 40 76

gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr

1. Introduction

Many studies have reported discrepancies between predicted change with nutrient budgets and observed changes of soil nutrient pools or the monitoring of ecosystems nutrition indicators. For instance, using the isotopic dilution technique, soil Ca pools remained constant (van der Heijden *et al.*, submitted Ecosystems) while Ca budgets suggested Ca depletion (van der Heijden *et al.*, accepted FEM). Some authors have suggested that trees may access nutrient sources that are not currently taken into account in the biogeochemical cycling of Mg and Ca (Johnson and Todd, 1998; Bailey *et al.*, 2003; Jandl *et al.*, 2004; Grigal and Ohmann, 2005; Yanai *et al.*, 2005). Generally the relation between plant growth and soil chemical fertility is not yet fully understood. Some studies have found relations between foliar concentrations and soil pools (Miller and Watmough, 2009; Lucash *et al.*, 2012), other studies have showed no relations (Jandl *et al.*, 2004). Foliar Ca concentration in pedunculated oak, sessile oak and European beech has been related to rainfall during the growing season (Jonard *et al.*, 2009). Finally, other studies have also pointed out discrepancies between exchangeable Ca pools in the soil and foliar Ca concentrations: base cation depletion and low exchangeable base cation pools in the soil were not reflected in foliar Ca concentrations (Miller and Watmough, 2009; van der Heijden *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, accepted FEM).

A possible explanation would be that trees are able to take nutrients up from deep soil layers. That tree uptake occurs in superficial layers of the soil is a commonly accepted paradigm. Indeed, in base poor soils, the forest floor and topsoil represented a major base cation pool (Olsson *et al.*, 1996; Vejre and Hoppe, 1998; Hansson *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, accepted FEM). Furthermore, studies, through natural isotopic variations or isotopic tracing techniques, have shown that the O layer could be a very important source of Mg and Ca for plant uptake (Farkaš *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, submitted Biogeochemistry). However, there is evidence that tree species may “improve” or sustain topsoil or forest floor chemistry by taking up nutrient from deep mineral soil layers and “concentrating” them in the O layer and the topsoil via litterfall (biological cycling) (Nowak *et al.*, 1991; Fisher, 1995; Dijkstra and Smits, 2002; Brandtberg *et al.*, 2004). This phenomenon has been named the base-pump effect (Vejre and Hoppe, 1998).

Discrepancies between predicted and observed change of soil nutrient pools may be due to a poor estimation of the nutrient uptake flux. Indeed, plant-internal cycling of nutrients may buffer low nutrient availability by reducing the amounts of nutrients absorbed in the soil each year. Weatherall *et al.* (2006) estimated that internal cycling of Mg contributed 32 to 57% of total Mg content in new growth in young Sitka spruce. Similarly, Proe *et al.* (2000) estimated the contribution of Mg internal cycling in young Scots pine (~52%). However, while it is commonly accepted that Mg is mobile in plant tissues such as leaves or needles (e.g. Dambrine *et al.*, 1991; Hodson and Sangster, 1998; Bolou-Bi *et al.*, 2012), Ca is more controversial. For instance, some heartwooded tree species such as oak have been proven to remobilize Ca in woody tissues during heartwood formation (Penninckx *et al.*, 2001). However, remobilization of divalent cations is very variable among tree species (e.g. Meerts, 2002).

Augusto *et al.* (2011) injected stable isotope tracers (^{15}N , ^{26}Mg and ^{42}Ca) into the stems of 8-year old Maritime pine (*Pinus pinaster* (Ait)). Mg and Ca tracers were only detected in needles 2 years after their application while high ^{15}N enrichments were observed two months after the

injection. Authors concluded that N transport from root to shoot is driven by mass flow while base cation transport is reactive (ion exchange processes with the xylem vessel cell walls). This suggests that the biological cycling of Mg and Ca may be much slower and Mg and Ca in woody tissues may be much more mobile than previously thought. This would then suggest that trees may buffer low nutrient availability by remobilizing plant-internal nutrient sources.

The main objectives of the present study were (1) to map Mg and Ca uptake in the soil profile and (2) study the translocation of Mg and Ca from the roots to the crown. For this purpose, stable isotopes of magnesium and calcium (^{26}Mg and ^{44}Ca) were used to trace the fate of rainfall Mg and Ca in the forest soil of a 35 year-old beech stand. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer uptake and allocation in above ground tree organs was measured and a model was developed to simulate the uptake of tracers.

2. Material and methods

2.1. Study site

The experimental site of Breuil-Chenue forest (hereafter named Breuil-Chenue site) is located in the Morvan Mountains, Burgundy, France (latitude 47°18'10", longitude 4°4'44"). The elevation is 640 m, the annual rainfall 1180 mm, the mean annual potential evapo-transpiration (PET) 750 mm and the mean annual temperature 9°C (computed over the period 2006-2010). The soil is a sandy Allocrisol (Alumic Cambisol; WRB FAO) displaying micro-podzolisation features in the upper mineral horizon (Ranger *et al.*, 2004). The soil parent material is granite, containing 23.5% quartz, 44% K-feldspar, 28.5% plagioclase, 1.6% biotite and 1.6% muscovite (Mareschal, 2008). In 1975, part of the native forest (coppice with standards) located on a homogeneous soil type was clear-cut, heaving swathing was carried out. Effectively, all brash and the humus layer were removed from the plot. Plots covering 1000 m² were planted with different species in 1976. A plot of native forest was left un-cut.

Horizon	Depth <i>cm</i>	Bulk density $\phi < 2\text{mm}$	Soil Texture			C <i>g.kg⁻¹</i>	C/N	Soil cationic exchange capacity				
			Sand %	Silt %	Clay %			ECEC <i>cmolc.kg⁻¹</i>	Organic CEC %	BS %	Mg <i>cmolc.kg⁻¹</i>	Ca <i>cmolc.kg⁻¹</i>
A1/E	0-5	0.50	57.6	21.8	20.6	72.6	18.0	8.66	74	19.4	0.23	0.54
A1-A1/Bp	5-10	0.64	60.2	21.5	18.4	46.1	18.1	7.23	63	10.9	0.13	0.15
Sal 1	10-15	0.67	58.0	23.6	18.4	34.2	18.1	5.43	57	7.9	0.08	0.07
Sal 2	15-25	0.89	60.0	24.1	16.0	23.3	17.9	4.08	51	5.8	0.04	0.02
Sal 2	25-40	0.90	57.8	24.7	17.5	14.0	17.1	3.13	38	7.4	0.03	0.02
Sal 3	40-55	1.08	55.7	25.8	18.5	-	-	3.11	-	8.1	0.02	0.01
II Sal 4	55-70	1.05	57.3	25.3	17.5	-	-	3.32	-	8.1	0.03	0.02

Table VII-1: Description of soil chemical and physical properties in the beech plot at the Breuil-Chenue experimental site. Bulk density is given for the soil particules smaller than 2mm diameter (mass of soil particules smaller than 2mm/total volume of soil). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC).

The present study focused on the beech plot (*Fagus sylvatica* L). The humus type in this plot was described in 2003 as a mesomull (Brethes *et al.*, 1995): the OL-layer was 0.5 to 1cm thick, the OF-layer was very thin and discontinuous and no OH-layer was observed (Moukoui, 2006). The humus layer (hereafter referred to as the litter layer) represented 22 000 kg.ha⁻¹ of dry matter, 12 kg.ha⁻¹ of Mg and 54 kg.ha⁻¹ of Ca. Soil chemical properties were measured from

16 soil profiles (0 to 70cm depth) collected in 2001. A description of soil properties is given in Table VII-1.

2.2. Multi-isotopic tracing experiment design

2.2.1. Application of the stable isotope tracers

A subplot of the beech plot (hereafter named tracing plot) was equipped in 2009 to carry out a tracing experiment on April 7th, 2010. The plot covered 80 m². The tracing solution (350ppm Mg; 200ppm Ca) was made up by dissolving enriched ^{26}MgO (99.25 atom% ^{26}Mg) and $^{44}\text{CaCO}_3$ (96.45atom% ^{44}Ca). Twenty liters of the tracing solution were sprayed on the ground of the tracing plot representing a 0.25 mm rainfall event. 16 mm of deionised water were sprayed on the tracing plot over a period of 8 hours so as to simulate a natural rainfall event. The tracing plot was monitored during the two years after the application of tracers as detailed below. To avoid a second application of tracer from litterfall, at each fall, all litterfall was collected by setting nets around each tree. Litterfall was replaced by fresh litter collected in the second 35 year-old beech plot of the Breuil-Chenue site.

2.2.2. Isotope ratio notation

Measured isotopic compositions of samples are expressed with the absolute value of the isotope ratio ($^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) or in permil deviations relative to the Mg and Ca reference ratios (DSM3 (Galy *et al.*, 2003) and NIST SRM 915a respectively):

$$\delta^{26/24}\text{Mg} = \left\{ \left(\frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3}} - 1 \right\} \times 1000 \quad (2)$$

$$\delta^{44/40}\text{Ca} = \left\{ \left(\frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{NIST915a}} - 1 \right\} \times 1000 \quad (3)$$

To account for ^{26}Mg and ^{44}Ca applied tracers in each ecosystem compartment, it is necessary to distinguish ^{26}Mg and ^{44}Ca present naturally in Mg and Ca pools from ^{26}Mg and ^{44}Ca present due to the application of the tracers. Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca in a sample or ecosystem compartment was calculated assuming that natural isotopic composition (control isotopic composition) was 0‰ for both Mg and Ca:

$$\text{excess}(^yX)_{\text{sample}} = [X]_{\text{sample}} \times (\% ^yX_{\text{sample}} - \% ^yX_{\text{nat}}) \quad (4)$$

where $\text{excess}(^yX)$ is the excess of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) due to the application of the tracer in the sample (or compartment), $[X]_{\text{sample}}$ the concentration or total amount of total element (Mg or Ca) in the sample (or compartment), $\% ^yX_{\text{sample}}$ the atom percent of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) in the sample (or compartment) and $\% ^yX_{\text{nat}}$ the atom percent of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) at natural abundance (assumed 0‰). Atom percent of the tracer isotopes are calculated as follows:

$$\% ^{26}\text{Mg} = \frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{1 + ^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg} + ^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \quad (5)$$

$$\% ^{44}\text{Ca} = \frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{1 + ^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \quad (6)$$

where $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ are the measured ratios in samples, $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$, $^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, $^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, $^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ and $^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ were assumed to be constant and equal to terrestrial values: 0.1266 for $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$, 6.677×10^{-3} for $^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, 1.3926×10^{-3} for $^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, 4.1262×10^{-5} for $^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ and 1.929×10^{-3} for $^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ (Hoefs, 2009). Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca is expressed in $\text{mol}\cdot\text{ha}^{-1}$ or in percentage of applied tracers.

2.3. Measuring tracers in the ecosystem

2.3.1. Monitoring ^{26}Mg and ^{44}Ca in soil solution

Soil solutions were collected every 28 days with hand-made PEHD zero-tension lysimeters (ZTL) placed between the litter layer and the soil surface (hereafter referred to as 0 cm depth) and at 10cm depth (3 replicates), and with ceramic tension-cup lysimeters (TCL; Oikos Umweltanalytik GBR, Ceramic P80, porosity 45 μm , alumina-silica), with an applied pressure of 0.6 bars, at 15, 30 and 60cm depth (4 replicates/depth). Solutions were stored in 60mL polypropylene bottles at 4°C.

Date	Replicates	Sampled depth	Litter layer	Soil extractions
08/04/2010	4	15 cm	Yes	
14/04/2010	8	15 cm	Yes	Yes
04/05/2010	8	15 cm	Yes	Yes
18/05/2010	8	15 cm	Yes	Yes
15/06/2010	8	15 cm	Yes	Yes
15/07/2010	8	30cm	Yes	Yes
10/08/2010	8	30cm	Yes	
08/09/2010	8	15cm	Yes	Yes
04/10/2010	8	30cm	Yes	
04/11/2010	8	30cm	Yes	Yes
03/01/2011	8	30cm	Yes	
22/02/2011	8	30cm	Yes	
22/03/2011	8	45cm	Yes	Yes
19/04/2011	8	45cm	Yes	Yes
16/05/2011	8	45cm	Yes	Yes
11/07/2011	8	45cm	Yes	
05/09/2011	4	60cm	Yes	Yes
30/11/2011	4	60cm	Yes	
21/03/2012	4	60cm	Yes	Yes

Table VII-2: Summary of soil and litter sampling dates, number of replicates and depth sampled.

2.3.2. Monitoring ^{26}Mg and ^{44}Ca in the litter and soil layers

During two years after the tracing experiment, soil profiles were sampled with a cylindrical corer (sampling dates are given in Table VII-2) to measure the Mg and Ca isotopic composition of the litter-layer, the soil exchangeable pools and microbial biomass (van der Heijden *et al.*, submitted Ecosystems). The litter-layer (L+F) was collected directly above each sampled soil profile. Litter-layer samples were oven-dried (65°C) and milled. $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ in the bulk litter-layer were measured by digesting litter-layer samples with 50% nitric acid. $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ in the exchangeable pool of the litter-layer were measured using ammonium acetate as extractant: 2.5g of dried litter-layer were shaken with 50mL of 1 mol.L-1 ammonium acetate for 1h. Extraction solutions were then filtered.

Sampled soil profiles were divided into 5 cm-thick layers progressively down to 60cm depth (Table VII-2). Exchangeable $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ were measured after two consecutive extractions: 7.5 g of field fresh soil was shaken with 50mL of 1 mol.L-1 ammonium acetate for 1h then centrifuged. The supernatant was collected after each extraction and mixed together before being filtered. Soil microbial biomass ^{26}Mg and ^{44}Ca (Mg_{mic} and Ca_{mic}) were measured using a CFE procedure: 7.5 g of field-fresh soil was weighed in glass vials and fumigated with chloroform for 24h. Unfumigated samples served as controls. Fumigated samples were extracted following the same protocol as CEC extractions (detailed above). Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca was computed for both fumigated and unfumigated samples with equation (3) and (4). Mg_{mic} , Ca_{mic} , $^{26}Mg_{mic}$ and $^{44}Ca_{mic}$ were calculated based on 35°C oven-dry soil by subtracting unfumigated soil extractions (Mg_{exch} and Ca_{exch}) from fumigated soil extractions. Fumigated extractions were carried out on soil samples in the 0-30 cm soil layer.

2.3.3 Sample analysis methods

Ca and Mg concentrations in samples (soil solutions, soil CEC extractions, biomass digests) were measured by ICP-AES (Jobin-Yvon 180 ULTRACE) and $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ isotope ratios were measured with ICP-MS (Bruker 820MS) following isotope analysis methods described by van der Heijden *et al.* (accepted Plant and Soil). Given natural isotope variations and ICP-MS measurement precision, a tracer detection limit was set for $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ at 10‰.

2.4. Immobilization of ^{26}Mg and ^{44}Ca in above-ground biomass

In February 2012, a light thinning was carried out in the tracing plot and five trees were cut to measure ^{26}Mg and ^{44}Ca total uptake during the two years after the tracing experiment. Figure VII-1 summarizes the sampling protocol. The trunk of each felled tree was cut into one-meter-long logs and each log was weighed (fresh weight). Branches were separated according to their diameter and their height in the tree canopy (top, middle and bottom) and the fresh weight of each compartment was measured. A set of samples from each compartment were used to determine fresh biomass humidity: from the difference between fresh weight and 65°C oven-dry weight. Another set of samples from each compartment was oven-dried (65°C), milled and digested in 50% nitric acid. Total element concentrations in digests were measured by ICP-AES and isotopic ratios $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ was measured by ICP-MS. Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca was computed for each tree and each compartment with equation (3). Stumps were not removed during the thinning to avoid soil disturbances. Root tracer concentration and biomass was thus not available. Root biomass in the Breuil-Chenue beech plot was estimated using biomass

allometric equations fitted with root biomass data from a 25 year-old beech stand in Brittany, France (Legout, 2008). Tracer immobilisation in the root biomass was estimated by multiplying predicted root biomass with measured tracer concentrations in the stump. Total immobilized tracer was then calculated for each tree and allometric equations using tree circumference at breast-height were fitted to the data.

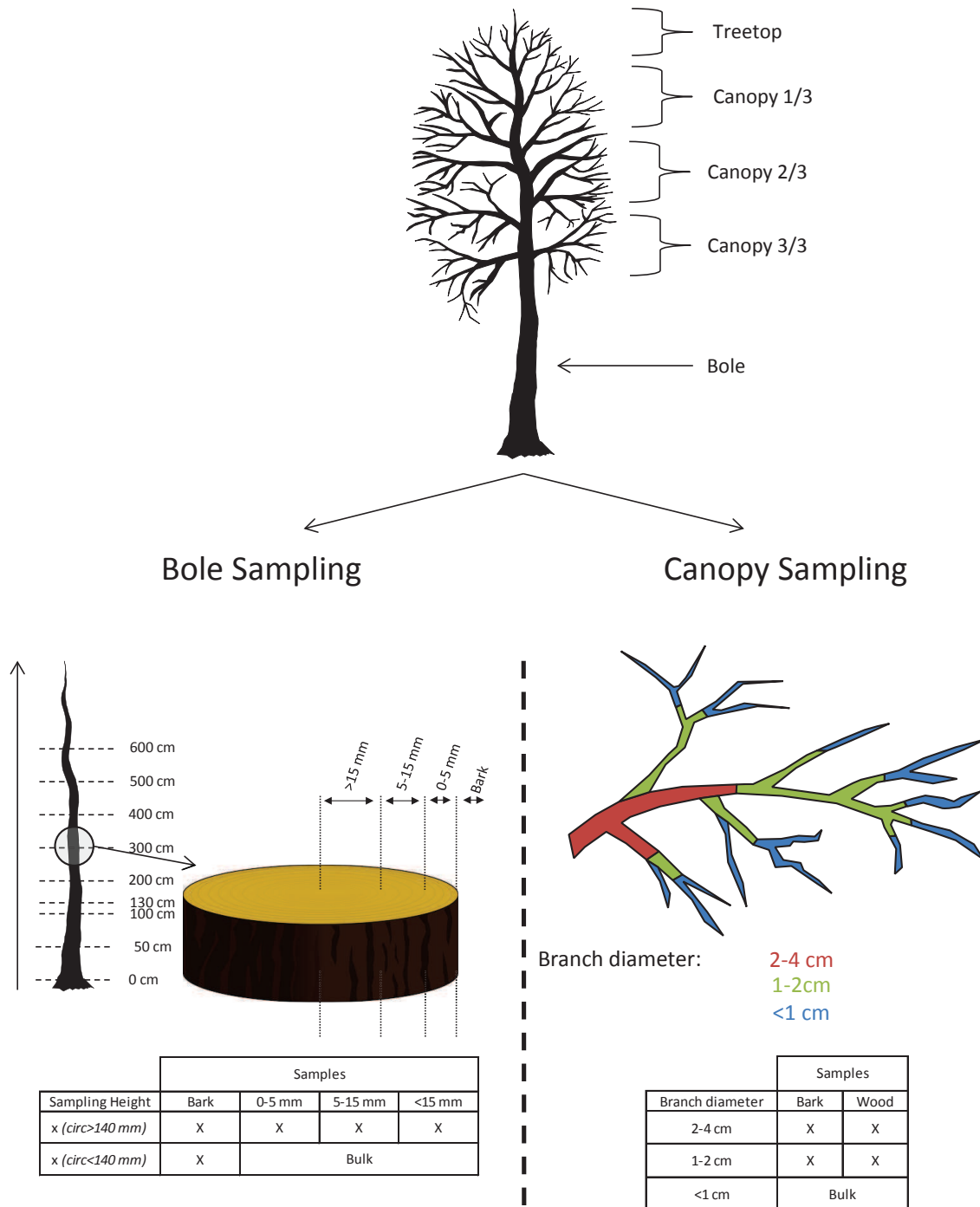


Figure VII-1: Schematic description of the biomass sampling protocol to measure ^{26}Mg and ^{44}Ca immobilization in above-ground tree organs during the two first years after the application of tracers.

2.5 Modeling ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake by trees

The uptake of ^{26}Mg and ^{44}Ca was modeled in two different ways: a water mass flow based model using the transpiration flux and soil solution composition and an exchangeable pool source based model.

2.5.1. Water mass flow based model

In this uptake model, Mg and Ca uptake was assumed to be related to water mass flow (transpiration flux) and the composition of soil solution. To define the relative importance of the different soil solutions collected at different depths (0cm, 10cm, 15cm, 30cm and 60cm), total ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake was computed for each depth separately by coupling, at each time step, the total transpiration flux, which was modeled with the forest hydrology model BILJOU (van der Heijden *et al.*, accepted Geoderma), with the isotopic composition of the soil solution considered as follows:

$$Uptake_z(^yX) = \sum_t \{TR(t) \times [^yX]_z(t)\} \quad (7)$$

where yX is the isotopic tracer (^{26}Mg or ^{44}Ca), $Uptake_z(^yX)$ the total uptake of yX over the two years (mol.m^{-2}) computed with soil solution from the depth z (0cm, 10cm, 15cm, 30cm and 60cm), $TR(t)$ the total transpiration flux at time step t (L.m^{-2}), $[^yX]_z(t)$ the concentration of yX in the soil solution at depth z at time step t (mol.L^{-1}).

2.5.2. Exchangeable pool source base model

In this uptake model, the soil was divided into layers: litter layer, soil 0-2.5cm, 2.5-5cm, 5-10cm, 10-15cm, 15-30cm and 30-60cm layers. The Mg and Ca uptake flux was computed as the sum of Mg and Ca immobilization in ligneous organs of trees (bole and branches) and Mg and Ca in litterfall. In the model, the annual uptake flux was assumed to be constant over the vegetation season (April to October). The isotopic composition of the uptake flux was assumed to be equal to the isotopic composition of the uptake source layer. This assumption was supported by the isotopic composition of fine roots which were strongly correlated to the isotopic composition of the soil exchangeable pool (van der Heijden *et al.*, accepted Plant and Soil). The isotopic composition of the exchangeable Mg and Ca pool in the litter layer was estimated from the isotopic composition of ZTL at 0cm depth.

Firstly, the maximum contribution of the different sources of Mg and Ca in the soil profile (litter layer, soil 0-2.5cm, 2.5-5cm, 5-10cm, 10-15cm, 15-30cm and 30-60cm layers) to ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake was computed. Total ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake was computed for each layer separately by coupling, at each time step, the uptake flux with the isotopic composition of the layer considered as follows:

$$Uptake_z(^yX) = \sum_t \{U_X(t) \times [^yX]_{Exch,z}(t)\} \quad (8)$$

where yX is the isotopic tracer (^{26}Mg or ^{44}Ca), $Uptake_z(^yX)$ the total uptake of yX over the two years (mol.m^{-2}) computed with layer z (litter, soil 0-2.5cm, 2.5-5cm, 5-10cm, 10-15cm, 15-

30cm and 30-60cm), $U_X(t)$ the uptake of total element X (Mg or Ca) flux at time step t (mol.m^{-2}), $[^yX]_{Exch,z}(t)$ the concentration of yX in layer z at time step t expressed in mol of tracer (yX) per mole of total element (X) (mol.mol^{-1}).

Secondly, to estimate the contribution of the different litter and soil layers to Mg and Ca uptake, ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake was computed as follows:

$$Uptake(^yX) = \sum_t \left(\sum_z \left\{ a_z \times U_X(t) \times [^yX]_{Exch,z}(t) \right\} \right) \quad (9)$$

where yX is the isotopic tracer (^{26}Mg or ^{44}Ca), $Uptake(^yX)$ the total uptake of yX over the two years (mol.m^{-2}) computed for the whole soil profile (litter and soil layers), a_z percentage of uptake occurring in layer z , $U_X(t)$ the uptake of total element X (Mg or Ca) flux at time step t (mol.m^{-2}), $[^yX]_{Exch,z}(t)$ the concentration of yX in layer z at time step t expressed in mol of tracer (yX) per mole of total element (X) (mol.mol^{-1}).

The percentage of uptake occurring in each layer (a_z) were parameters which were adjusted independently for ^{26}Mg and ^{44}Ca . a_z parameters verified (1) modeled ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake equal to measured ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake and (2):

$$\sum_z(a_z) = 100\% \quad (10)$$

Because many (a_1, a_2, \dots, a_n) solutions verified the equation system and to simplify the resolution of this equation system, the soil profile was discretized as follows: litter layer, soil 0-2.5cm, 2.5-5cm, 5-60cm layers. Deep soil layers were not discretized because tracers were mainly retained in the first centimeters of the soil (van der Heijden *et al.*, submitted Biogeochemistry) and the isotopic signatures of deep soil layers were similar.

3. Results

3.1. Sources of ^{26}Mg and ^{44}Ca for tree uptake in the soil profile

3.1.1. Mg and Ca uptake based on water mass flow

The relative importance of the different soil solutions collected in the soil profile was assessed separately in Table VII-1. Measured ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake could not be computed with the water mass flow based model whatever the type and depth of soil solution collected. Modeled ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake was highest when considering ZTL soil solutions at 0 cm depth (53% and 78% respectively) and decreased rapidly with soil solution sampling depth.

Depth	^{26}Mg		^{44}Ca	
	Mean	SD	Mean	SD
	% of total tracer uptake			
0 cm	53%	16%	78%	11%
10 cm	23%	1%	49%	7%
15 cm	4%	2%	6%	1%
30 cm	1%	1%	5%	1%
60 cm	0%	0%	6%	0%

Table VII-3: Maximum contribution of the different soil solutions collected in the soil profile to ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake expressed in percentage of measure ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake.

The measured excess ^{26}Mg and ^{44}Ca concentrations in soil solutions collected with tension cup lysimeters were compared to the modeled proportion of the water transpiration flux from the soil layer around the lysimeter (Figure VII-2). The highest ^{26}Mg and ^{44}Ca isotope enrichments were observed in soil solutions collected by ZTL at 0cm and 10cm depth (van der Heijden *et al.*, submitted Biogeochemistry). Below 15cm depth, ^{26}Mg and ^{44}Ca in soil solution decreased rapidly with depth and no ^{26}Mg and ^{44}Ca was observed at 60 cm depth. During the vegetation season, soil water content decreased due to transpiration at 15cm, 30cm and 60cm depth. Water uptake was thus shifted downwards in the soil profile. Over 2010-2011, 49% of the water transpiration flux was taken up in the 0-15cm layer, 33% in the 15-40cm layer and 18% in the 40-70cm layer.

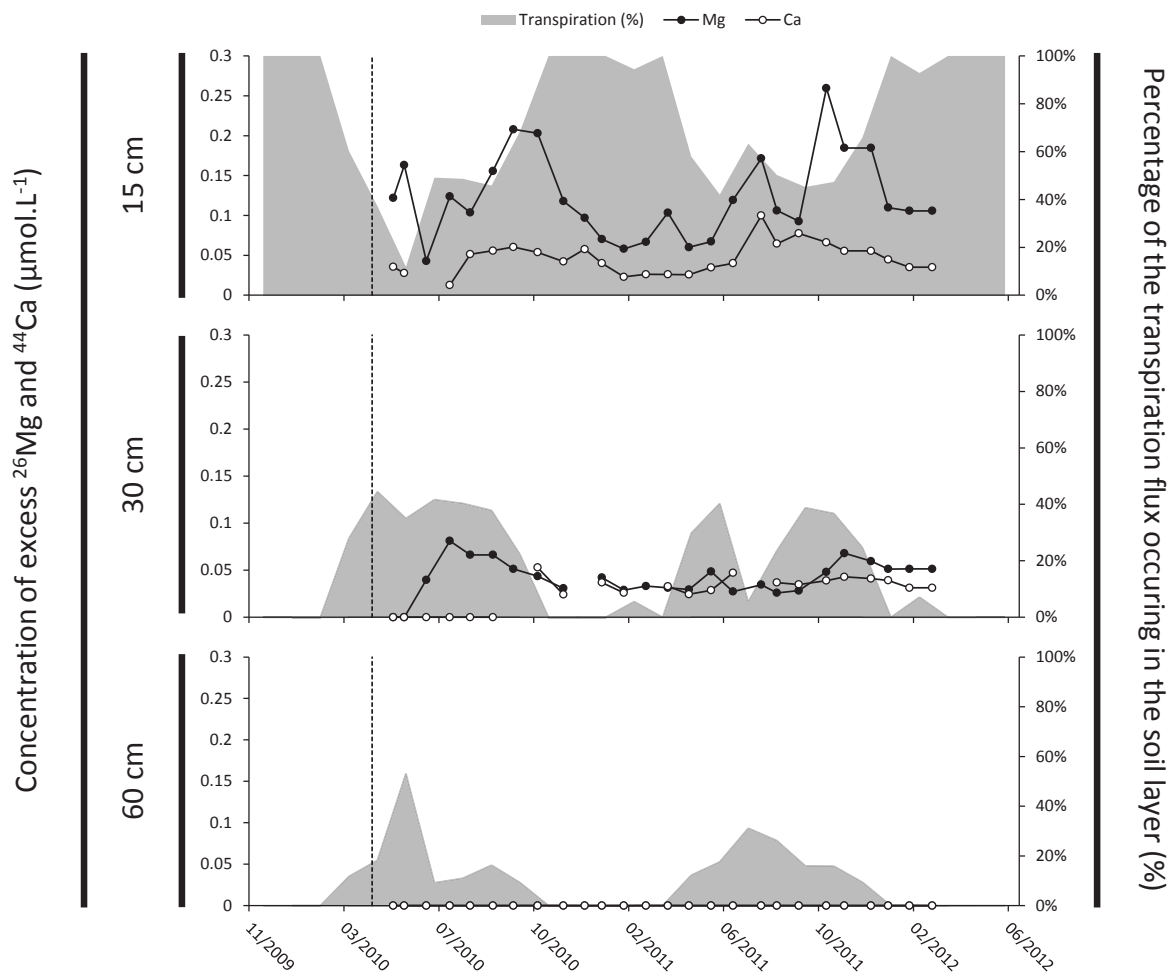


Figure VII-2: Monitoring of excess ^{26}Mg and ^{44}Ca concentrations in soil solutions ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) collected with tension-cup lysimeters (mean of 4 replicates) and the modeled proportion of the water transpiration flux (van der Heijden *et al.*, accepted *Geoderma*) from the soil layer around the lysimeter at 15 cm, 30 cm and 60 cm depth during the two first years after the application of tracers. The vertical discontinuous line represents the application of tracers.

3.1.2. Mg and Ca uptake based on exchangeable pool sources

The maximum contribution of the different litter and soil layers was assessed (Table VII-2). For both Mg and Ca, no soil layer was able to explain 100% of the total tracer uptake. As tracer concentrations in the exchangeable pools were much higher in the soil layers close to the

surface, the maximum contribution of these layers was high: 56% and 88% for Mg and Ca respectively for the 0-2.5cm layer, 40% and 66% for the 2.5-5cm layer. Below 15cm depth, tracer concentrations in the exchangeable pools were low. As a result the maximum contribution of these layers was also very low (<10% of total tracer uptake for both Mg and Ca).

Only the litter layer was able to contribute over 100% of ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake. However, the maximum contribution of the litter exchangeable and total Mg and Ca pool differed. The maximum contribution of the exchangeable Mg and Ca pools was higher than total pools. What is more, the maximum contribution of the litter Mg total pool was well below 100%.

Depth	^{26}Mg		^{44}Ca	
	Mean	SD	Mean	SD
	% of total tracer uptake			
Litter (Exch)	107%	16%	152%	49%
Litter (Bulk)	23%	2%	131%	16%
0-2.5 cm	56%	9%	88%	20%
2.5-5 cm	40%	8%	66%	19%
5-10 cm	23%	4%	36%	11%
10-15 cm	17%	4%	24%	10%
15-30 cm	8%	3%	8%	3%
30-60 cm	2%	1%	2%	0%

Table VII-4: Maximum contribution of the different sources of Mg and Ca in the soil profile to ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake expressed in percentage of measure ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake. "Litter (Exch)" and "Litter (Bulk)" refer to the litter exchangeable Mg and Ca and litter total Mg and Ca pools respectively.

The Mg and Ca uptake vertical profile in the soil was assessed by solving the equation system described above. There were many solutions to the equation system and the range of variation of these solutions is given in Figure VII-3. For both Mg and Ca, the exchangeable Mg and Ca pool of the litter layer was an important source for uptake, contributing from 82% to 94% for Mg and from 35% to 65% for Ca. If the contribution of the litter layer increased, the contribution of the topsoil (0-2.5cm) decreased from 18% to 0% for Mg and from 46% to 0% for Ca. the contribution of the 2.5-15 cm layer varied from 0% to 3% for Mg and from 0% to 16%. If the contribution of the litter layer increased, so did the contribution of deeper soil layers: from 0% to 2% for Mg and from 5% to 15% for Ca for the 15-30cm layer and from 0% to 2% for Mg and from 5% to 30% for Ca for the 15-30cm layer and.

3.2. Translocation from root to crown

3.2.1. Monitoring fine root tracer concentrations

The isotopic composition of fine roots revealed the absorption of ^{26}Mg and ^{44}Ca (Figure VII-4). The isotope enrichment of fine roots increased continuously during the first year after the application of tracers. In May 2010, fine roots in the 0-15cm soil layer were slightly enriched 35‰ to 50‰ ($\delta^{26}\text{Mg}$) and 20‰ to 70‰ ($\delta^{44}\text{Ca}$). In October, the ^{26}Mg and ^{44}Ca isotope enrichment of fine roots varied respectively from 180‰ and 175‰ (0-2.5cm) to 30‰ and 0‰ (25-30cm). Finally in March 2011 (one year after the application of tracers), the isotope

enrichment of fine roots varied respectively from 340‰ and 330‰ (0-2.5cm) to 10‰ (40-45cm) and 0‰ (25-30cm).

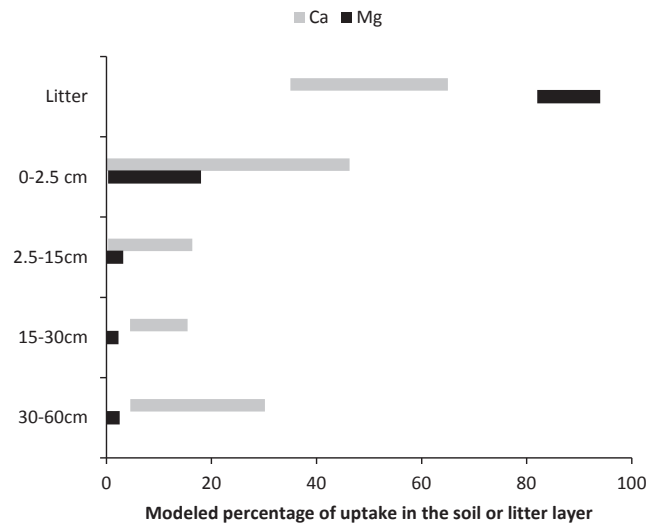


Figure VII-3: Range of variation of modeled Mg and Ca uptake profiles (percentage of uptake in the different litter and soil layers: 0-2.5cm, 2.5-15cm 15-30cm and 30-60cm).

3.2.2. Monitoring foliar tracer concentration

While fine roots were rapidly enriched in ^{26}Mg and ^{44}Ca , during the first year after the application of the tracer (2010), no ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer was observed in leaves (Figure VII-5). Relatively few samples showed any ^{26}Mg and ^{44}Ca in leaves during the second year (2011) and measured isotope enrichments were low. The majority of samples were below the tracer detection limit. However, very high ^{15}N isotope enrichments were observed in leaves as soon as May 2010 (one month after the application of tracers) and throughout the study period.

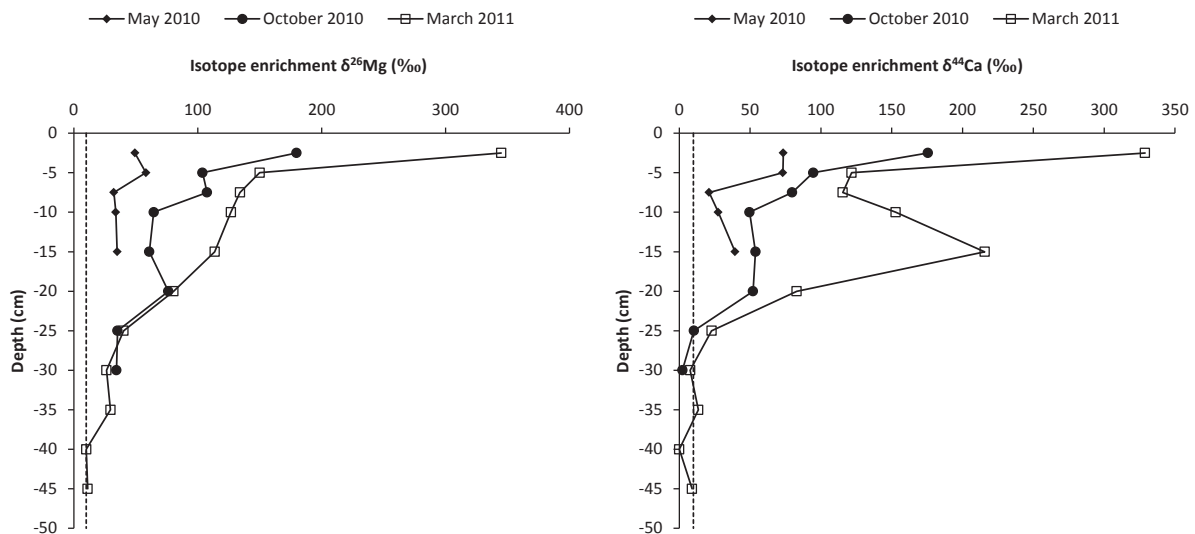


Figure VII-4: Isotopic composition of fine roots during the first year after the application of tracers (expressed in ‰).

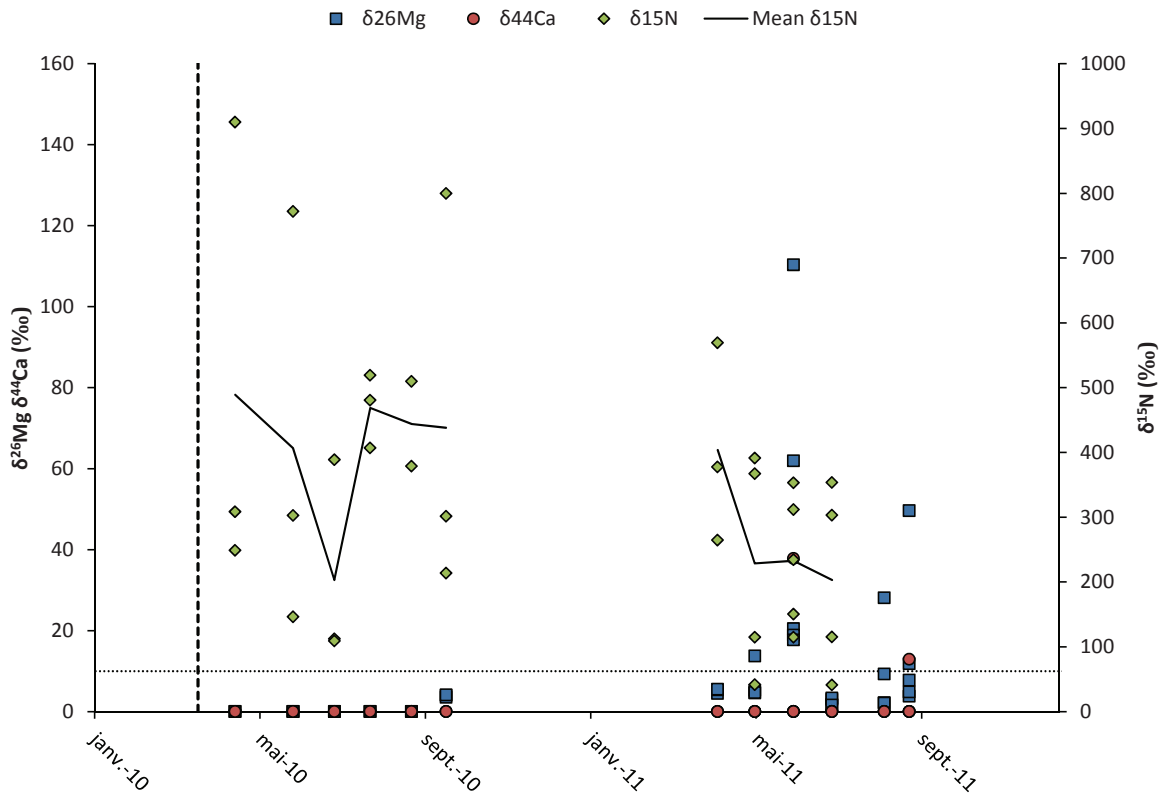


Figure VII-5 : Isotopic composition of leaves during two years after the application of tracers. The discontinuous vertical line represents the application of tracers. The discontinuous horizontal line represents the ^{26}Mg and ^{44}Ca analytical detection limit.

3.2.3. Mapping of ^{26}Mg and ^{44}Ca in above-ground ligneous tree organs

The isotopic composition of the different tissues of the different organs of sampled trees was measured in February 2012. The isotopic composition for individual trees is detailed in the supplementary material (Table VII-6 and Table VII-7). The mean tracer and total element concentrations in the different tissues of the bole are presented in Figure VII-6. A gradient of ^{26}Mg and ^{44}Ca concentrations was observed with sampling height: tracer concentration was higher at the base of the tree and decreased with height. For both Mg and Ca, the external wood rings showed the highest tracer concentrations (0-5mm and 5-15mm). Tracer concentrations in bark were higher than in wood for both ^{26}Mg and ^{44}Ca . ^{44}Ca concentrations in inner wood rings were close to zero while ^{26}Mg concentrations were only slightly lesser than in external wood rings. ^{44}Ca of bole tissues decreased more sharply with sampling height than ^{26}Mg and ^{44}Ca concentration in bark and wood rings (5-15mm) were below the detection limit above ~7m. ^{44}Ca concentrations in external wood rings (0-5mm) remained above the detection limit but were very low.

Mg and Ca concentrations in wood and bark tissues were more or less constant with tree height. However, a horizontal gradient of Mg and Ca concentration was observed whatever the height: higher concentrations in the inner wood rings and lower concentrations in the external wood rings. Concentrations in bark tissues were higher for both Mg and Ca but relatively to external wood rings, Ca concentrations in bark were much higher (9.5 fold) than Mg (3.3 fold).

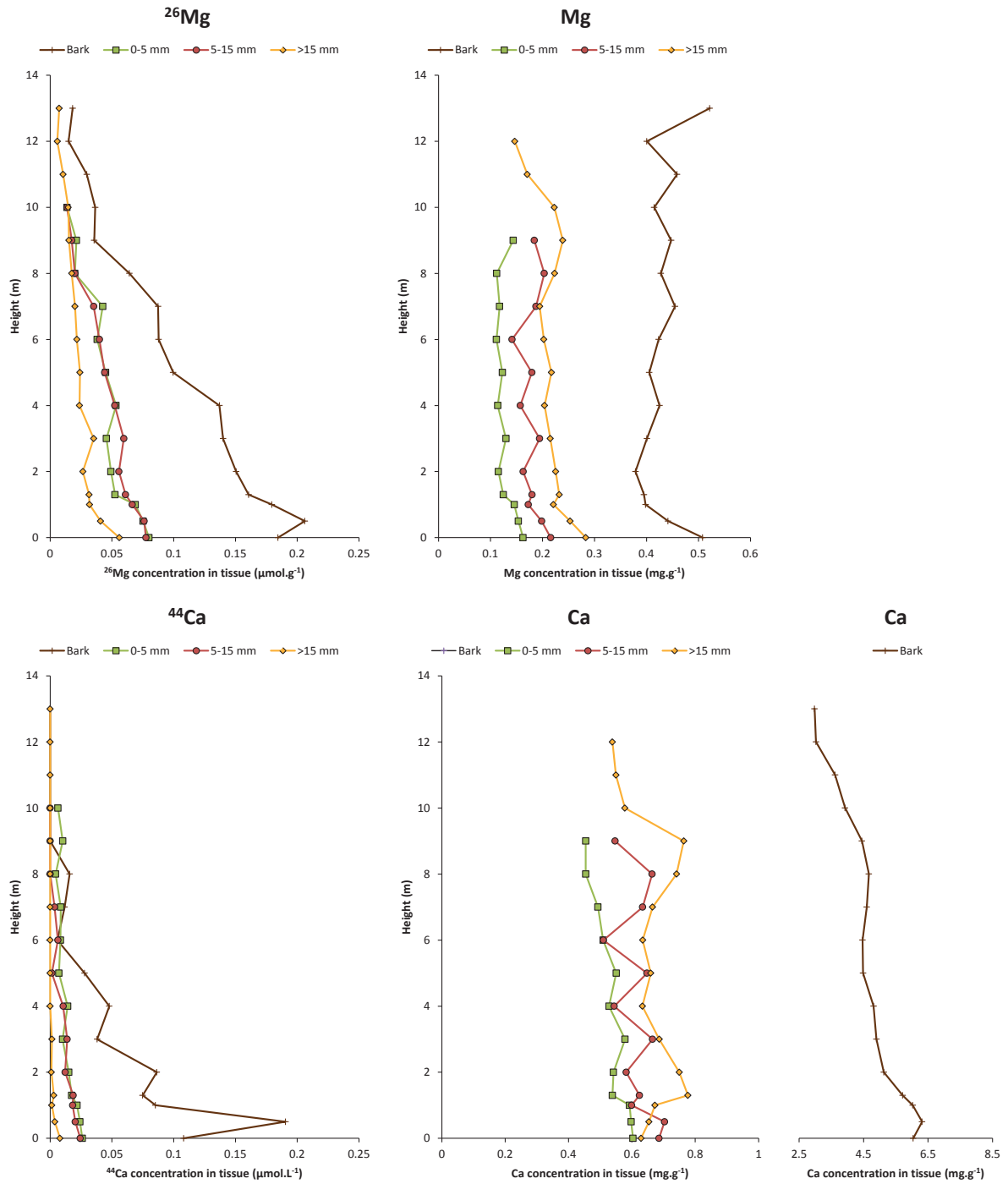


Figure VII-6: Mean tracer ^{26}Mg and ^{44}Ca and total Mg and total Ca concentration in the different ligneous tissues of the bole (bark, wood: 0-5mm, 5-15mm and >15mm) (Figure VII-1) as a function of height (m).

^{26}Mg isotope enrichment in branches was low whatever the height in the canopy and whatever the tissue (bark or wood) (Table VII-5). ^{44}Ca isotope enrichment in branches was below the detection limit.

Compartment	Branche width	$\delta^{26}\text{Mg}$ (‰)		$\delta^{44}\text{Ca}$ (‰)	
		Wood	Bark	Wood	Bark
treetop	<1cm	11.6		<10	
Canopy 1/3	<1cm	14.8		<10	
	1-2cm	24.8	23.0	<10	<10
	2-4cm				
Canopy 2/3	<1cm	12.5		<10	
	1-2cm	19.9	17.2	<10	<10
	2-4cm	26.2	24.1	<10	<10
Canopy 3/3	<1cm	18.0		<10	
	1-2cm	20.3	19.0	<10	<10
	2-4cm	25.1	25.8	<10	<10

Table VII-5: Mean isotopic composition of the different ligneous tissues of the canopy (wood and bark) as a function of branch diameter and height in the canopy (1/3, 2/3 and 3/3) (Figure VII-1)

4. Discussion

4.1 Mapping Mg and Ca uptake in the soil profile

4.1.1. Mg and Ca uptake was not related to water mass flow

Modeling ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake with a water mass flow model (function of the soil solution concentrations and the transpiration flux) was unsuccessful. No matter what depth considered, the model predicted ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake inferior to measured uptake. Two hypotheses may explain the inability to model tracer uptake from soil solutions:

- i. Soil solution accessed and used by trees is not sampled with current methods. On the one hand, tension-cup lysimeters samples capillary water but the applied pressure only extracts water of hydric potential (pF) above ~ 3.5 and plants may access water down to $\text{pF} \sim 4.2$. Presently, such high energy capillary water may only be sampled after centrifugation and may thus not be frequently monitored over a long period of time (destructive sampling). On the other hand, capillary soil solution is rarely collected in the topsoil (0-5cm) where many processes essential to plant nutrition occur (for instance organic matter decomposition, high root density, soil biological activity).
- ii. Mg and Ca uptake may not be related to soil solution and evapotranspiration. Indeed, Figure VII-2 shows that during the vegetation seasons in 2010 and 2011 the soil water uptake profile was shifted to deeper soil layers where soil water content was higher ($\sim 60\text{cm}$). However, in the deep soil layers, the isotopic composition of soil solution was close to natural abundance. Mg and Ca uptake may be spatially independent from water uptake but also temporally (McClain *et*

al., 2003). Total annual nutrient uptake may occur over a very short period of time as opposed to continuously during the vegetation season.

4.1.2. The litter layer was the main Mg and Ca source for tree uptake

The nutrient source for plant uptake is the soil solution in the generally accepted paradigm. However, soil solutions are in equilibrium with the soil solid phase. Furthermore in a previous paper (van der Heijden *et al.*, accepted Plant and Soil), the isotopic composition of fine roots was shown to be strongly correlated to the isotopic composition of the surrounding soil exchangeable pool. Finally, ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake could not be modeled with current soil solution data. ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake was therefore modeled using the soil exchangeable Mg and Ca pools as the source of Mg and Ca uptake.

Modeling results (Table VII-4) showed that total ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake could not be achieved if Mg and Ca uptake occurred solely in the soil layers and suggested that most of Mg and Ca uptake occurred in the surface soil layers and the litter-layer. Estimating the relative contribution of each layer to total uptake was difficult because there were more unknowns than there were equations. However, the range of possible solutions was determined (Figure VII-3) and evidenced possibly different uptake sources of Mg and Ca.

The litter layer was the main contributor to the uptake flux for both Mg and Ca, representing from 82% to 94% and from 35% to 65% respectively of the total Mg and Ca uptake flux. However, the litter layer represented a higher proportion of uptake for Mg than for Ca. The topsoil layer (0-2.5cm) was also an important Mg and Ca source for uptake representing from 0% to 18% and from 0% to 46% of the total Mg and Ca uptake flux. Soil layers below 2.5cm only represented a small proportion of Mg uptake (at the most 6%). Ca uptake below 2.5cm was more important than Mg from 18% to 37% and the percentage of Ca uptake below 15 cm depth varied from 10 to 35%.

The vertical profiles of Mg and Ca uptake in the soil differed. Mg uptake mainly occurred in the litter layer and in the very topsoil (0-2.5cm). The litter layer and the topsoil were also very important sources of Ca for plant uptake however our results also evidence a significant contribution of deeper soil layers. Ca uptake from deep soil layer has been reported by many studies. Brandtberg *et al.* (2004) injected radio isotope ^{45}Ca at different depths in the soil and monitored tracers in leaves/needles but no could not estimate the relative importance of the different soil layers to uptake. Dijkstra and Smits (2002) by modeling Ca uptake evidenced that slight differences in uptake from deep soil layers could change significantly the distribution of Ca in the soil profile. The difference in the Mg and Ca uptake profiles was surprising because the distribution of Mg and Ca exchangeable pools in the soil were fairly similar (Table VII-1). Moreover, soil exchangeable Mg pools were slightly higher than Ca in depth and given estimated weathering fluxes higher rates of Mg release from mineral weathering is expected (van der Heijden *et al.*, accepted FEM).

Although Ca uptake from deep soil horizons is a potential explanation to the discrepancy observed between nutrient budgets and Ca soil exchangeable pools (van der Heijden *et al.*, submitted Ecosystems), such a high contribution of deep soil horizons seems unlikely for four main reasons:

- i. Soil exchangeable Ca pools below 10 cm depth were only of $24 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ representing only 1.5 years of Ca uptake (pool size/annual uptake)
- ii. Ca transfer from the topsoil is a very slow process. Therefore it is likely the Ca flux resulting from litter decomposition and throughfall would not compensate for Ca uptake in soil layers below 10cm depth.
- iii. The Ca weathering rate estimated with PROFILE was very low ($0.2 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$) and would thus not compensate for Ca uptake in soil layers below 10cm depth.
- iv. Uptake of Ca in deep soil layers would result in an accumulation of Ca in the litter layer through the “base-pump effect” (Nowak *et al.*, 1991; Fisher, 1995; Vejre and Hoppe, 1998; Dijkstra and Smits, 2002; Brandtberg *et al.*, 2004). Although accumulation of nutrients in the litter layer throughout the lifespan of broadleaved stands on base poor soils has been reported (Legout, 2008). An accumulation of calcium in the litter layer was not evidenced by an isotopic dilution study (van der Heijden *et al.*, submitted Ecosystems).

An overestimation of the contribution of deep soil layers by the modeling approach may be explained by two hypotheses: (1) the annual Ca uptake flux is overestimated due to plant-internal cycling of Ca and/or (2) Ca may be directly absorbed by the leaves (Bukovac and Wittwer, 1957; Chishaki *et al.*, 2007) thus reducing the Ca uptake in the soil profile.

4.2. Translocation of base cations from the roots to the canopy

4.2.1. The transpiration xylem sap stream is a chromatography column

The monitoring of the isotopic composition of fine roots evidenced that Mg and Ca tracers were very rapidly absorbed by fine roots in the soil (Figure VII-4). In May 2010 (one month after the application of tracers), $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$ in fine roots exceeded the tracer detection limit and measured excess ^{26}Mg and ^{44}Ca in fine roots increased continuously during the first year after the application of tracers. However, during the first year after the tracing experiment (2010), no excess ^{26}Mg or ^{44}Ca was measured in leaves (Figure VII-5). During the second year (2011), only a few sampled branches showed excess ^{26}Mg ; $\delta^{44}\text{Ca}$ remained under the detection limit. Furthermore, litterfall showed no excess ^{26}Mg or ^{44}Ca . Our results are evidence that Mg and Ca absorption by fine roots is rapid but the transport of Mg and Ca from the roots to the canopy is a slow process. The mapping of tracers in tree organs in 2012 was in agreement with such a hypothesis. Indeed, ^{26}Mg and ^{44}Ca concentrations in ligneous tissues were highest at the base of the bole (Figure VII-6) and decreased with tree height. Very little amounts of ^{26}Mg and no ^{44}Ca were found in the canopy organs (Table VII-5). Our results seemed to be in contradiction with those of Brandtberg *et al.* (2004) which showed a detectable uptake of ^{45}Ca , a radio-isotope, by trees only 1 month after isotopes application onto soils. However, radio-isotope recovery in the foliage was estimated to be only 0.04 to 0.31% (Augusto *et al.*, 2011). Our results were in agreement with those of a tracing experiment using stable isotopes of N, Mg and Ca (Augusto *et al.*, 2011). Excess ^{15}N was measured in leaves as soon as May 2010 (one month after the tracing experiment) evidencing that the slow transfer of Mg and Ca from the roots to the canopy was not an artifact of the tracing experiment. Nevertheless, part of the delay between N and base cations may be explained by a slower transfer of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the litter and soil profile (van der

Heijden *et al.*, submitted Biogeochemistry): ^{26}Mg and ^{44}Ca may have been accessible to root uptake later.

The xylem vessels act as a chromatography column due to the cationic exchange capacity of the cell walls of the vessels (pectate) (Biddulph *et al.*, 1959; Biddulph *et al.*, 1961; Bell and Biddulph, 1963; Shear and Faust, 1970; Vandegheijn and Petit, 1979). In the xylem transpiration flux, N is mainly found under the following forms: organic N and nitrate (Marschner, 1995). N species in the sap flow are thus either not or negatively charged. N transport from the roots to the canopy was probably governed by water mass flow (transpiration flux). This would explain why ^{15}N was transported to the canopy much faster than both Mg and Ca. It is also probable that Mg was more rapidly transported to the foliage because Ca affinity for organic CEC is much higher than Mg (Salmon, 1964; André and Pijarowski, 1977; Baes and Bloom, 1988; Ponette *et al.*, 1997; Curtin *et al.*, 1998; DeSutter *et al.*, 2006). Whereas Ca ions form strong complexes with some organic functional groups, Mg ions mainly bind through electrostatic bonds (Sentenac and Grignon, 1981). Ca may also precipitate as calcium-oxalate crystals (Nakata, 2003; Franceschi and Nakata, 2005). Many studies have suggested that Mg and Ca may also be transported in the sap flow under soluble organic-complex forms thus increasing Mg and Ca mobility in the xylem vessels (Bradfield, 1976; Schell, 1997). Given the very slow observed transport of Mg and Ca from the roots to the canopy at the tracing experiment plot, it would appear that ion exchange is the main process in the translocation of Mg and Ca.

Isotope fractionation along the transpiration stream has been reported for Mg (Bolou-Bi *et al.*, 2010; Bolou-Bi *et al.*, 2012) for Ca (Holmden and Bélanger, 2010; Cobert *et al.*, 2011). For Mg, fractionation favored the transport of the light isotope: the stem/crown of plants was enriched in ^{24}Mg compared to roots. For Ca, fractionation favored the transport of the heavy isotope: the stem/crown of plants was enriched in ^{44}Ca compared to roots. Therefore, part of the observed Mg isotope enrichment gradient (Figure VII-6) may be explained by isotope fractionation processes but the Ca isotope enrichment gradient cannot. Furthermore, reported Mg isotopic composition differences between the roots and crown were very small: 1.75‰ at the maximum. It is thus unlikely that the distribution of isotope tracers in the bole may be solely explained by isotopic fractionation processes.

The vertical isotope enrichment gradient observed for both Mg and Ca may be explained by (1) the progressive absorption of tracers by roots and/or (2) the isotopic dilution of ^{26}Mg and ^{44}Ca enriched sap by Mg and Ca in ligneous tissues (close to natural abundance).

4.2.2. Radial transfer of Mg and Ca

In beech trees, sap flow may occur in a wide section of the stem as beech trees lack typical heartwood (Tessier Du Cros, 1981; Schweingruber, 1993). However, the results from the tracing experiment suggest that Mg and Ca translocation mainly occurred in the external wood rings. Indeed, although ^{26}Mg concentrations in inner wood rings (>15mm) were quite high, ^{44}Ca concentrations were close to 0 at all sampled heights (Figure VII-6). This suggests that Ca is only transported in the external wood rings (0-5mm and 5-15mm). High ^{26}Mg concentrations in inner wood rings may be explained by higher mobility of Mg in wood tissues (diffusion). Kuhn *et al.* (2000) when studying Mg and Ca entry in roots also found that Mg was more rapidly transported to the xylem. Metzner *et al.* (2010) however found contrasting results when tracing Mg and Ca transport in the stem. Authors observed much higher Ca diffusion in tissues

surrounding xylem vessels than Mg. Authors did however stress that this unexpected result may be due to a plant response to the shock of the cutting of the stem.

6. References

- André, J.P., Pijarowski, L., 1977. Cation exchange properties of sphagnum peat: exchange between two cations and protons. *Journal of Soil Science* 28, 573-584.
- Augusto, L., Zeller, B., Midwood, A.J., Swanston, C., Dambrine, E., Schneider, A., Bosc, A., 2011. Two-year dynamics of foliage labelling in 8-year-old *Pinus pinaster* trees with (^{15}N), (^{26}Mg) and (^{42}Ca) simulation of Ca transport in xylem using an upscaling approach. *Ann For Sci* 68, 169-178.
- Baes, A.U., Bloom, P.R., 1988. Exchange of Alkaline Earth Cations in Soil Organic Matter. *Soil Science* 146, 6-14.
- Bailey, S.W., Buso, D.C., Likens, G.E., 2003. Implications of sodium mass balance for interpreting the calcium cycle of a forested ecosystem. *Ecology* 84, 471-484.
- Bell, C.W., Biddulph, O., 1963. Translocation of Calcium. Exchange versus Mass Flow. *Plant physiology* 38, 610-614.
- Biddulph, O., Cory, R., Biddulph, S., 1959. Translocation of Calcium in the Bean Plant. *Plant physiology* 34, 512-519.
- Biddulph, O., Nakayama, F.S., Cory, R., 1961. Transpiration stream & ascension of calcium. *Plant physiology* 36, 429-436.
- Bolou-Bi, E.B., Poszwa, A., Leyval, C., Vigier, N., 2010. Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geochim Cosmochim* 74, 2523-2537.
- Bolou-Bi, E.B., Vigier, N., Poszwa, A., Boudot, J.P., Dambrine, E., 2012. Effects of biogeochemical processes on magnesium isotope variations in a forested catchment in the Vosges Mountains (France). *Geochim Cosmochim* 87, 341-355.
- Bradfield, E.G., 1976. Calcium complexes in the xylem sap of apple shoots. *Plant Soil* 44, 495-499.
- Brandtberg, P.O., Bengtsson, J., Lundkvist, H., 2004. Distributions of the capacity to take up nutrients by *Betula* spp. and *Picea abies* in mixed stands. *Forest Ecol Manag* 198, 193-208.
- Brethes, A., Brun, J., Jabiol, B., Ponge, J., Toutain, F., 1995. Classification of forest humus forms: a French proposal. *Ann. For. Sci.* 52, 535-546.
- Bukovac, M.J., Wittwer, S.H., 1957. Absorption and Mobility of Foliar Applied Nutrients. *Plant physiology* 32, 428-435.
- Chishaki, N., Yuda, K., Inanaga, S., 2007. Differences in mobility of calcium applied to the aboveground parts of broad bean plants (*Vicia faba* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 53, 286-288.
- Cobert, F., Schmitt, A.D., Bourgeade, P., Labolle, F., Badot, P.M., Chabaux, F., Stille, P., 2011. Experimental identification of Ca isotopic fractionations in higher plants. *Geochim Cosmochim* 75, 5467-5482.
- Curtin, D., Selles, F., Steppuhn, H., 1998. Estimating Calcium-Magnesium Selectivity in Smectitic Soils from Organic Matter and Texture. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 1280-1285.
- Dambrine, E., Legoaster, S., Ranger, J., 1991. Growth and mineral-nutrition of a spruce stand on poor soil. 2. Root uptake and translocation of minerals during growth. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* 12, 791-808.
- DeSutter, T.M., Pierzynski, G.M., Baker, L.R., 2006. Flow-through and batch methods for determining calcium-magnesium and magnesium-calcium selectivity. *Soil Sci Soc Am J* 70, 550-554.
- Dijkstra, F.A., Smits, M.M., 2002. Tree species effects on calcium cycling: The role of calcium uptake in deep soils. *Ecosystems* 5, 385-398.
- Farkaš, J., Déjeant, A., Novák, M., Jacobsen, S.B., 2011. Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca^{2+} in a base-poor forest: A new concept of combining stable ($\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$) and radiogenic (ϵCa) signals. *Geochim Cosmochim* 75, 7031-7046.
- Fisher, R.F., 1995. Amelioration of degraded rain-forest soils by plantations of native trees. *Soil Sci Soc Am J* 59, 544-549.
- Franceschi, V.R., Nakata, P.A., 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. In, *Annual Review of Plant Biology. Annual Reviews, Palo Alto*, pp. 41-71.

- Galy, A., Yoffe, O., Janney, P.E., Williams, R.W., Cloquet, C., Alard, O., Halicz, L., Wadhwa, M., Hutcheon, I.D., Ramon, E., Carignan, J., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM980 and new reference materials for magnesium-isotope-ratio measurements. *J Anal Atom Spectrom* 18, 1352-1356.
- Grigal, D.F., Ohmann, P.R., 2005. Calcium and Forest Systems: Diffusion From Deep Sources. *Soil Science* 170, 129-136.
- Hansson, K., Olsson, B.A., Olsson, M., Johansson, U., Kleja, D.B., 2011. Differences in soil properties in adjacent stands of Scots pine, Norway spruce and silver birch in SW Sweden. *Forest Ecol Manag* 262, 522-530.
- Hodson, M.J., Sangster, A.G., 1998. Mineral deposition in the needles of white spruce *Picea glauca* (Moench.) Voss. *Annals of Botany* 82, 375-385.
- Hoefs, J., 2009. *Stable Isotope Geochemistry*, 6th Edition. Springer-Verlag, Germany.
- Holmden, C., Bélanger, N., 2010. Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochim Cosmochim* 74, 995-1015.
- Jandl, R., Alewell, C., Prietzel, J., 2004. Calcium loss in Central European forest soils. *Soil Sci Soc Am J* 68, 588-595.
- Johnson, D.W., Todd, D.E., 1998. Harvesting effects on long-term changes in nutrient pools of mixed oak forest. *Soil Sci Soc Am J* 62, 1725-1735.
- Jonard, M., André, F., Dambrine, E., Ponette, Q., Ulrich, E., 2009. Temporal trends in the foliar nutritional status of the French, Walloon and Luxembourg broad-leaved plots of forest monitoring. *Ann For Sci* 66, 412-421.
- Kuhn, A.J., Schroder, W.H., Bauch, J., 2000. The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots. *Planta* 210, 488-496.
- Legout, A., 2008. Cycles Biogéochimiques et bilans de fertilité minérale en hêtraies de plaine. AGROPARISTECH-ENGREF, Nancy, 281
- Lucash, M.S., Yanai, R.D., Blum, J.D., Park, B.B., 2012. Foliar Nutrient Concentrations Related To Soil Sources Across A Range Of Sites In The Northeastern United States. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76, 674-683.
- Mareschal, L., 2008. Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur minéralogie : bilan après 28 ans dans le site expérimental de Breuil (Morvan). *Ressources Procédés Produits Environnement*, Université Henri Poincaré, Nancy, 328
- Marschner, H., 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic, London.
- McClain, M.E., Boyer, E.W., Dent, C.L., Gergel, S.E., Grimm, N.B., Groffman, P.M., Hart, S.C., Harvey, J.W., Johnston, C.A., Mayorga, E., McDowell, W.H., Pinay, G., 2003. Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems* 6, 301-312.
- Meerts, P., 2002. Mineral nutrient concentrations in sapwood and heartwood: a literature review. *Ann For Sci* 59, 713-722.
- Metzner, R., Thorpe, M.R., Breuer, U., Blumler, P., Schurr, U., Schneider, H.U., Schroeder, W.H., 2010. Contrasting dynamics of water and mineral nutrients in stems shown by stable isotope tracers and cryo-SIMS. *Plant Cell Environ.* 33, 1393-1407.
- Miller, D.E., Watmough, S.A., 2009. Soil acidification and foliar nutrient status of Ontario's deciduous forest in 1986 and 2005. *Environ Pollut* 157, 664-672.
- Moukoui, J., 2006. Effet des essences forestières sur la biodégradation des matières organiques : impacts sur la dynamique et le cycle du carbone, de l'azote et des éléments minéraux. Université Henri Poincaré, Nancy, 255
- Nakata, P.A., 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164, 901-909.
- Nowak, C.A., Downard, R.B., White, E.H., 1991. Potassium trends in red pine plantations at Pack-Forest, New-York. *Soil Sci Soc Am J* 55, 847-850.
- Olsson, B.A., Bengtsson, J., Lundkvist, H., 1996. Effects of different forest harvest intensities on the pools of exchangeable cations in coniferous forest soils. *Forest Ecol Manag* 84, 135-147.
- Penninckx, V., Glineur, S., Gruber, W., Herbauts, J., Meerts, P., 2001. Radial variations in wood mineral element concentrations: a comparison of beech and pedunculate oak from the Belgian Ardennes. *Ann For Sci* 58, 253-260.

- Ponette, Q., Dufey, J.E., Weissen, F., 1997. Downward movement of dolomite, kieserite or a mixture of CaCO_3 and kieserite through the upper layers of an acid forest soil. *Water Air Soil Pollut.* 95, 353-379.
- Proe, M.F., Midwood, A.J., Craig, J., 2000. Use of stable isotopes to quantify nitrogen, potassium and magnesium dynamics in young Scots pine (*Pinus sylvestris*). *New Phytol* 146, 461-469.
- Ranger, J., Andreux, F., Bienaimé, S., Berthelin, J., Bonnaud, P., Boudot, J.P., Bréchet C, Buée, M., Calmet, J., Chaussod, R., Gelhaye, D., Gelhaye, L., Gérard, F., Jaffrain, J., Lejon, D., Le Tacon, F., Lévêque, J., Maurice, J., Merlet, D., Moukouri, J., Munier-Lamy, C., Nourrisson, G., Pollier, B., Ranjard, L., Simonsson, M., Turpault, M.P., Vairrelles, D., Zeller, B., 2004. Effet des substitutions d'essence sur le fonctionnement organo-minéral de l'écosystème forestier, sur les communautés microbiennes et sur la diversité des communautés fongiques mycorhiziennes et saprophytes (cas du dispositif de Breuil - Morvan), Rapport final contrat INRA-GIP Ecofor 2001-24, No. INRA 1502A. INRA Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (UR 1138), 54280 Champenoux,
- Salmon, R.C., 1964. Cation exchange reactions. *Journal of Soil Science* 15, 273-283.
- Schell, J., 1997. Interdependence of pH, malate concentration, and calcium and magnesium concentrations in the xylem sap of beech roots. *Tree Physiol* 17, 479-483.
- Schimansky, C., 1988. Comparative investigations on leaf uptake of magnesium using solutions containing 28Mg
Vergleichende Untersuchungen über die Blattaufnahme von Magnesium aus 28Mg-haltigen Applikationslösungen. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchtverwertung* 38, 5-9.
- Schweingruber, F.H., 1993. *Trees and wood in dendrochronology : morphological, anatomical, and tree-ring analytical characteristics of trees frequently used in dendrochronology* Springer-Verlag, Berlin.
- Sentenac, H., Grignon, C., 1981. A model for predicting ionic equilibrium concentrations in cell-walls. *Plant physiology* 68, 415-419.
- Shear, C.B., Faust, M., 1970. Calcium transport in apple trees. *Plant physiology* 45, 670-674.
- Tessier Du Cros, E., 1981. *Le hêtre*. INRA, Paris.
- van der Heijden, G., Legout, A., Midwood, A.J., Craig, C.A., Pollier, B., Ranger, J., Dambrine, E., accepted *Plant and Soil*. Mg and Ca root uptake and vertical transfer in soils assessed by an in situ ecosystemscale multi-isotopic (^{26}Mg & ^{44}Ca) tracing experiment in a beech stand (Breuil-Chenue, France). *Plant Soil*.
- van der Heijden, G., Legout, A., Nicolas, M., Ulrich, E., Johnson, D.W., Dambrine, E., 2011. Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change. *Forest Ecol Manag* 261, 730-740.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Bréchet, C., Ranger, J., Dambrine, E., 2013. Tracing and modeling preferential flow in a forest soil — Potential impact on nutrient leaching. *Geoderma* 195-196, 12-22.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Ranger, J., Dambrine, E., submitted *Biogeochemistry*. The role of soil organic matter in the biogeochemical cycling of Mg and Ca in forest ecosystems on base poor soils. *Biogeochemistry*.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Ranger, J., Dambrine, E., submitted *Ecosystems*. Fate of calcium and magnesium rainfall inputs in a forest ecosystem on base poor soil assessed with a isotopic tracing experiment (^{26}Mg and ^{44}Ca) *Ecosystems*.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Turpault, M.P., Ranger, J., Dambrine, E., accepted *FEM*. Sustainability of broadleaved forest nutrition facing reduced atmospheric deposition - A case study in the Morvan Mountains. *Forest Ecol Manag*.
- Vandegeijn, S.C., Petit, C.M., 1979. TRANSPORT OF DIVALENT-CATIONS - CATION-EXCHANGE CAPACITY OF INTACT XYLEM VESSELS. *Plant Physiology* 64, 954-958.
- Vejre, H., Hoppe, C., 1998. Distribution of Ca, K, Mg, and P in acid forest soils in plantations of *Picea abies* - Evidence of the base-pump effect. *Scandinavian Journal of Forest Research* 13, 265-273.
- Weatherall, A., Proe, M.F., Craig, J., Cameron, A.D., Midwood, A.J., 2006. Internal cycling of nitrogen, potassium and magnesium in young Sitka spruce. *Tree Physiol* 26, 673-680.
- Wittwer, S.H., Teubner, F.G., 1959. Foliar absorption of mineral nutrients. *Annual review of plant physiology* 10, 13-30.

Yanai, R.D., Blum, J.D., Hamburg, S.P., Arthur, M.A., Nezat, C.A., Siccama, T.G., 2005. New insights into calcium depletion in northeastern forests. *J. For.* 103, 14-20.

Supplementary Material

Table VII-6: ⁴⁴Ca isotopic composition of the different ligneous tissues of the bole (bark, wood: 0-5mm, 5-15mm and >15mm) and canopy (Bark and wood) as a function of bole height (m), or height in canopy and branch diameter (Figure VII-1).

$\delta^{44}\text{Ca}$		Tree n°14				Tree n°22				Tree n°33				Tree n°34				Tree n°35					
		>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark	>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark	>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark	>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark	>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark		
Treetop	Branches <1cm			-1.9			-7.3				-3.1				-8.2					0.4			
1/3	Branches <1cm			-0.6			-7.1				-5.9				-5.0					-1.2			
	Branches 1-2cm Branches 2-4cm			0.3	2.5		-6.7	-3.2							-2.6	-4.9				5.4	3.7		
2/3	Branches <1cm			-5.0			-6.3				-5.0				-4.3					-5.4			
	Branches 1-2cm			-1.9	0.7		-3.3	17.9			0.1	0.0			-2.8	-3.4				1.1	0.6		
	Branches 2-4cm			-3.2	-1.2		-2.7	-5.9												6.3	7.4		
3/3	Branches <1cm			-2.5			-6.8				2.4				-4.9					-4.9			
	Branches 1-2cm			-4.0	-3.3		-3.0	-2.4			7.7	4.9			-2.3	-2.1				-0.8	3.2		
	Branches 2-4cm			5.1	8.6		-3.8	-1.6							-6.6	-4.2				4.3	10.2		
Epicormic branches	Branches <1cm			27.9			4.4				23.4				27.1								
	Branches 1-2cm			-7.1	-1.3										21.8	8.8							
	Branches 2-4cm			-4.4	-3.5		-3.0	-6.7							-4.2	15.1							
Bole Height (m)	13																				4.5		
	12						-6.5														7.1		
	11	1.3					-4.2														2.8		
	10	-0.8					-2.4													2.8	3.3	14.6	9.4
	9	5.4	1.1	24.5			-3.5	1.4	0.3							0.4				-0.4	7.4	12.1	2.4
	8	-1.1	3.5	12.6			-3.4	-2.1	-2.2							6.8	0.4			0.4	9.3	25.0	11.3
	7	1.9	9.6	32.8	15.6	1.0	1.0	-1.1	-2.0	-7.2			-0.9	1.8		6.2	5.1	17.3	28.3	15.4			
	6	6.4	25.6	39.5	8.6	-2.6	3.0	-3.0	-3.1	-3.4			1.3	1.5						3.6	20.7	30.6	10.3
	5	3.1	20.1	28.0	14.1	-0.7	7.5	-1.1	-1.0	-3.2			18.4	0.5	6.3	15.2	6.1	0.9	8.9	34.1	18.4		
	4	8.4	49.1	51.9	17.2	4.3	3.9	7.0	-0.7	7.7			0.7	-1.6	13.3	33.8	22.9	1.6	52.5	79.0	40.7		
	3	9.8	58.0	83.2	30.2	1.0	10.3	2.8	0.9				7.1	6.7	2.9	19.7	28.9	23.2	12.8	61.8	33.0	12.5	
	2	5.4	53.2	55.5	24.8	2.6	8.2	4.5	2.5	-5.1	10.2	16.2	6.2	4.9	39.5	91.4	78.2	13.9	76.5	60.5	29.9		
	1.3	12.2	85.2	92.4	36.7	2.3	13.1	12.1	3.4	0.7	11.1	22.9	10.4	-0.2	43.7	95.1	38.5	20.8	84.0	49.3	21.8		
	1	8.0	59.5	77.1	27.0	1.9	26.5	23.6	6.3	-0.3	17.4	22.4	7.7	2.4	84.2	153.9	64.0	18.4	79.4	49.5	17.1		
	0.5	18.9	114.5	106.2	53.1	7.5	32.4	32.3	11.6	1.8	3.6	27.2	95.8	5.6	45.0	136.0	79.5	24.9	96.3	46.5	25.9		
	0	24.2	97.9	143.2	7.1	17.1	27.5	44.1	21.1	7.7	34.7	48.8	22.9	26.1	84.1	140.8	82.2	48.7	56.8	31.6	27.4		

Table VII-7: ^{26}Mg isotopic composition of the different ligneous tissues of the bole (bark, wood: 0-5mm, 5-15mm and >15mm) and canopy (Bark and wood) as a function of bole height (m), or height in canopy and branch diameter (Figure VII-1).

$\delta^{26}\text{Mg}$		Tree n°14				Tree n°22				Tree n°33				Tree n°34				Tree n°35						
		>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark	>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark	>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark	>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark	>15mm	5-15mm	0-5mm	Bark			
Treetop	Branches <1cm			11.9			6.1				9.1				7.2					23.5				
1/3	Branches <1cm			18.9			6.2				9.2				19.7					20.2				
	Branches 1-2cm			28.3	24.6		9.9	7.9							30.3	30.2				30.6	29.6			
2/3	Branches <1cm			17.3			6.2				11.5				11.6					15.7				
	Branches 1-2cm			20.3	16.7		16.1	5.7			16.4	15.9			20.1	21.6				26.7	26.4			
	Branches 2-4cm			18.2	22.0		9.7	8.0												50.8	42.4			
3/3	Branches <1cm			24.5			5.6				30.2				11.8					17.6				
	Branches 1-2cm			15.0	15.5		9.3	6.4			21.3	22.9			29.3	27.9				26.6	22.5			
	Branches 2-4cm			40.0	41.9		10.5	12.5							8.7	8.1				41.4	40.6			
Epicormic branches	Branches <1cm			99.9			36.4				39.2				117.6									
	Branches 1-2cm			19.0	11.3										97.4	47.5								
	Branches 2-4cm			22.8	22.1		4.8	5.4							30.9	31.9								
Bole Height (m)	13																		24.6		34.8			
	12					4.0			4.5										28.8		29.3			
	11	26.0			22.8	10.9			9.8										27.6		34.4			
	10	26.7			29.8	12.3			8.0										26.1	38.6	38.4	48.8		
	9	34.6	39.9	44.7	47.9	8.2	7.1	12.5	10.3				13.6		15.5	20.3	36.1	43.3	20.3	36.1	43.3	42.2		
	8	23.4	32.6	48.6	48.1	4.9	6.9	19.7	10.8				31.6		33.8	19.6	35.4	67.2	33.8	19.6	35.4	67.2	57.7	
	7	22.2	49.4	95.8	84.6	5.4	6.6	18.0	13.3	8.4		8.5	42.9		47.6	30.3	35.4	50.7	47.6	30.3	35.4	50.7	64.7	
	6	18.6	77.2	99.6	72.7	6.0	12.3	22.0	15.5	11.6		14.1	44.2		60.3	25.3	50.0	67.9	60.3	25.3	50.0	67.9	56.1	
	5	23.0	69.1	68.7	77.9	6.7	21.1	29.1	19.5	15.8		17.7	34.0	45.6	97.6	73.9	61.4	73.2	17.7	34.0	45.6	97.6	73.9	66.4
	4	30.7	91.8	101.2	83.0	9.8	22.9	39.9	29.8	22.1		22.0	37.8	49.9	95.1	99.7	23.5	83.7	22.0	37.8	49.9	95.1	99.7	103.4
	3	27.7	105.9	137.6	110.1	6.2	21.9	38.2	30.4			29.2	41.2	42.3	59.1	97.5	114.9	35.3	85.3	41.2	42.3	59.1	97.5	67.6
	2	35.3	108.6	109.2	105.8	11.6	34.1	38.7	30.7	8.8	22.5	38.9	36.3	50.3	100.8	157.5	154.1	34.0	102.6	8.8	22.5	38.9	36.3	83.5
	1.3	31.6	118.3	138.2	130.0	14.1	28.0	43.1	51.7	10.4	21.4	34.0	38.7	35.6	88.4	167.5	147.1	40.2	104.1	10.4	21.4	34.0	38.7	71.1
	1	23.1	110.5	123.9	127.9	17.0	61.8	62.2	49.4	15.2	18.5	41.4	42.4	46.7	128.9	210.8	174.5	41.5	110.1	15.2	18.5	41.4	42.4	84.9
	0.5	34.3	146.7	155.5	159.3		67.9	81.4	74.5	15.0	24.1	53.0	56.1	42.6	92.5	172.7	165.9	41.1	110.2	67.9	81.4	74.5	15.0	61.2
	0	38.6	114.7	197.2	177.9	21.8	50.0	82.1	127.7	21.4	46.3	70.2	70.7	50.1	100.5	175.6	163.6	52.8	75.0	21.8	50.0	82.1	127.7	60.1



VIII



Chapitre VIII – Bilans des traceurs dans l'écosystème deux ans après leur application

Ce chapitre propose un bilan des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans l'écosystème deux ans après l'apport des traceurs. Pour cela, les pools de traceurs ont été mesurés dans chaque compartiment de l'écosystème. La mesure de leur dilution isotopique a été utilisée pour déterminer l'évolution des pools de magnésium et de calcium échangeable du sol entre 2001 et 2012.

I. Résumé de l'étude

I.1. Introduction

Etudier l'évolution des réserves échangeables du sol au cours du temps est essentiel pour comprendre la durabilité de la fertilité chimique des sols des écosystèmes forestiers. L'évolution des stocks de nutriments dans le sol peut être directement mesurée en échantillonnant le sol d'une placette à deux dates différentes et en comparant les stocks mesurés aux deux dates. Cette approche possède néanmoins des limites. La difficulté majeure réside bien souvent dans la mesure d'une petite différence alors que la variabilité spatiale est forte. Dans ce cas, il est alors très difficile de statuer clairement sur l'évolution des stocks.

L'évolution des stocks de nutriments dans le sol sur une période donnée peut être indirectement estimée en calculant des bilans de flux « entrées-sorties » pour chaque nutriment (Ranger and Turpault, 1999). Cependant, l'approche des bilans de flux « entrées-sorties » n'a que très rarement été validée et de nombreuses incohérences entre les évolutions mesurées et prédites par les bilans ont été constatées. Ces incohérences peuvent être liées à une mauvaise estimation des flux entrants, sortants et interne à l'écosystème.

L'expérience de multi-traçage isotopique permet de suivre au cours du temps le parcours du magnésium et du calcium entrant dans l'écosystème par la pluie au sol et ainsi de quantifier les flux entre les différents compartiments de l'écosystème. La dilution isotopique du matériel enrichi initialement apporté dans les pools de l'écosystème et par les entrées dans l'écosystème depuis l'apport des traceurs permet d'estimer plus précisément ces pools et ces flux.

Ce chapitre a pour objectif premier de présenter le bilan des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca dans les différents compartiments de l'écosystème deux ans après l'apport des traceurs. Pour cela, la théorie de la dilution isotopique a été appliquée afin de déterminer l'évolution des stocks échangeables du sol entre 2001 et 2012.

I.2. Principaux résultats

I.2.1. Evolution des réserves échangeables de magnésium et de calcium dans le sol

Dans le cadre de l'expérience de multi-traçage isotopique dans la placette de hêtre, la théorie de la dilution isotopique a été appliquée à l'écosystème entier (sol et arbres) de manière à estimer l'évolution des différents pools de magnésium et de calcium depuis 2001.

Les pertes en magnésium estimées par les bilans de flux « entrées-sorties » ($-0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) ont ainsi pu être validées. La diminution des stocks de magnésium dans le profil de sol peut avoir eu lieu dans la couche de litière au sol et/ou dans les pools échangeables du sol. Cependant, il semblerait que le pool de magnésium dans la couche de litière n'ait pas diminué depuis 2001. En effet, la taille de ce pool a été validée en appliquant la théorie de la dilution isotopique au système « litière au sol » le lendemain de l'apport des traceurs isotopiques. L'accord entre mesure ou estimation des flux et dilution isotopique est un fort

argument en faveur de la justesse des flux mesurés ou estimés. Le faible flux d'altération calculé en fonction de surfaces minérales hypothétiques paraît donc vraisemblable.

La dilution isotopique du traceur ^{44}Ca dans l'écosystème entier a mis en évidence que les stocks de calcium dans le sol et dans la couche de litière au sol n'ont pas diminué depuis 2001. Les bilans de flux « entrées-sorties » de calcium ne seraient donc pas négatifs ($-3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) mais à l'équilibre. Un ou plusieurs flux entrants ou sortants ont donc été mal-estimés ou non pris en compte :

- i. Sous-estimation des apports atmosphériques de calcium ;
- ii. Sous-estimation du flux de libération de calcium par altération minérale ;
- iii. Surestimation de l'immobilisation dans la biomasse (recyclage interne à la plante de calcium ou prélèvement profond donc immobilisation surestimée dans le profil de sol 0-60cm).
- iv. Surestimation des pertes par drainage

Les pertes de calcium par drainage ($1.4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) ne peuvent pas compenser en totalité les bilans de calcium calculés ($-3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). Deux ans après l'apport du traceur ^{44}Ca , et en l'absence d'expériences complémentaires, les mesures de dilution isotopique ne permettent pas de d'identifier le ou les flux sur ou sous-estimés parmi les différentes hypothèses retenues. Cependant une surestimation du drainage ou de l'immobilisation affecterait logiquement autant le Mg que le Ca et signifieraient alors que les dépôts de Mg et/ou l'altération ont été surestimés.

I.2.2. Bilans des traceurs dans les différents compartiments de l'écosystème

Deux ans après l'apport des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca , $102.0\pm 11.3\%$ du ^{26}Mg et $100.2\pm 18\%$ du ^{44}Ca apportés ont été retrouvés dans les différents compartiments de l'écosystème (litière au sol, pool échangeable du sol, biomasse microbienne du sol et biomasse ligneuse).

La plus grande part des traceurs est retenue dans le profil de sol : $8.0\pm 3.0\%$ du ^{26}Mg et $32.8\pm 8.6\%$ du ^{44}Ca dans la litière au sol, $49.5\pm 2.5\%$ du ^{26}Mg et $47.1\pm 14.0\%$ du ^{44}Ca dans les pools échangeables du sol, $16.7\pm 5.9\%$ du ^{26}Mg immobilisés dans la biomasse microbienne. Dans le profil de sol, les traceurs ont été retenus dans les couches de sol superficielles : $34.8\pm 2.8\%$ du ^{26}Mg et $38.1\pm 10.5\%$ du ^{44}Ca dans la couche 0-5 cm et $17.6\pm 4.4\%$ du ^{26}Mg et $7.6\pm 4.7\%$ du ^{44}Ca dans la couche 5-10 cm. Enfin, $27.6\pm 9.0\%$ du ^{26}Mg et $20.4\pm 5.6\%$ du ^{44}Ca étaient immobilisés dans la biomasse ligneuse.

II. Fate of calcium and magnesium rainfall inputs in a forest ecosystem on base poor soil assessed with a isotopic tracing experiment (^{26}Mg and ^{44}Ca)

Gregory van der Heijden^{(1)*}, Arnaud Legout⁽¹⁾, Benoît Pollier⁽¹⁾, Jacques Ranger⁽¹⁾,
Etienne Dambrine⁽³⁾

Article soumis à ECOSYSTEMS le 10/12/2012

(1) INRA – UR 1138 Biogéochimie des Ecosystèmes forestiers, Route d'Amance, 54280 Champenoux, France

(3) INRA – UMR 042 CARTELE, Université de Savoie, Centre Interdisciplinaire Scientifique de la Montagne, Belledonne 226, 73376 Le Bourget-du-Lac Cedex

*Corresponding author

Tel : 03 83 39 73 27

Fax : 03 83 39 40 76

gregory.vanderheijden@nancy.inra.fr

Abstract

Nutrient budgets are commonly used to assess soil nutrient pool change with time. However, calculated internal cycling, input and output fluxes have scarcely been validated by measured field data. To study the fate of magnesium and calcium rainfall inputs in a forest on a base poor soil, an in situ tracing experiment using stable isotopes (^{26}Mg and ^{44}Ca) was carried out in April 2010.

Two years after the multi-isotopic tracing experiment in a 35-yr old beech stand in the Morvan Mountains (Burgundy, France), tracer recovery was measured in the different compartments of the ecosystem (Litter-layer and soil exchangeable pools, soil microbial and tree biomass). Isotope enrichment for the whole-ecosystem was computed and the isotopic dilution technique was applied to measure soil exchangeable Mg and Ca pool size in 2012.

In 2012, respectively $8.0\pm 3.0\%$ and $32.8\pm 8.6\%$ of applied ^{26}Mg and ^{44}Ca were retained in the litter-layer. $49.5\pm 2.5\%$ and $47.1\pm 14.0\%$ were retained by the soil CEC. Microbial biomass strongly immobilized Mg: $16.7\pm 5.9\%$ of ^{26}Mg . $27.6\pm 9.0\%$ and $20.4\pm 5.6\%$ were immobilized in tree biomass. Mg budgets calculated over 2003-2008 ($-0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$) were validated by the isotopic dilution technique. However, soil Ca pools were proven to be stable while Ca budgets predicted Ca depletion ($-3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$).

Although soil Mg and Ca pools were low, the incorporation of Mg and Ca inputs into the biogeochemical cycles was slow. However, Mg and Ca inputs were rapidly and efficiently retained in the different ecosystem compartments (litter-layer, CEC, microbial biomass) and no tracers were lost by leaching.

Introduction

French forests endure increasing external pressure due to climatic, atmospheric deposition and/or silvicultural changes. Indeed, many forest ecosystems on base-poor soils suffered during the XXth century from high S and N deposition, base cation pools were depleted and soils were acidified due to higher leaching of SO₄ and NO₃ (Landmann and Bonneau, 1995). Although S and N deposition has strongly decreased throughout Europe since the 1980s (Barrett *et al.*, 2000; Vuorenmaa, 2004; Cooper, 2005; Boxman *et al.*, 2008; Meesenburg *et al.*, 2009; van der Heijden *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, accepted FEM), base cation deposition has also decreased (Matzner and Meiwes, 1994; Hedin and Likens, 1996; Likens *et al.*, 1996; Vuorenmaa, 2004; Meesenburg *et al.*, 2009; van der Heijden *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, accepted FEM). What is more, forest policies encourage intensifying silvicultural practices to shorten production times and increase biomass harvest to meet the increasing demand for bio-energy (Ericsson, 2004; Puech, 2009). The sustainability of forest ecosystems on base-poor soils is uncertain in such a context.

Change in nutrient pools over time in forest ecosystems may be estimated by applying nutrient mass balance equations, known as nutrient input-output budgets (Ranger and Turpault, 1999), by monitoring inputs and outputs to the forest soil over a period of time. Nutrient budgets have been very widely used to assess the sustainability of forest soil chemical fertility (Bormann and Likens, 1967; Johnson and Todd, 1998; Likens *et al.*, 1998; Ranger and Turpault, 1999; Laclau *et al.*, 2005; Sverdrup *et al.*, 2006; Legout, 2008; Ranger *et al.*, 2008; Brumme *et al.*, 2009; van der Heijden *et al.*, 2011). However, nutrient budget results should be considered with precaution. Indeed, few studies have compared and/or validated computed nutrient budgets with measured change in soil nutrient pools. Discrepancies have been reported between nutrient budget results and measured change: predicted base cation depletion was often not validated by soil exchangeable base-cation change measured in soil samples collected at two different dates (Johnson *et al.*, 1997; Johnson and Todd, 1998; Likens *et al.*, 1998; Yanai *et al.*, 2005; McLaughlin and Phillips, 2006; Hazlett *et al.*, 2011; McLaughlin *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, 2011).

Change in the Mg and Ca pools in the different compartments of a forest ecosystem may also be assessed by spiking a given pool with a given isotope and monitoring the isotopic dilution over time. The size of the pool may then be calculated by measuring the isotopic composition of the pool. This technique has been used in many domains with different types of isotopes (stable or radioactive) (von Hevesy and Hofer, 1934; Forbes and Perley, 1951; Willison *et al.*, 1998; Cookson and Murphy, 2004; Achat *et al.*, 2009a; Achat *et al.*, 2009b; Stroud *et al.*, 2011). Mg and Ca stable isotopes may also be used to trace sources and processes (Kuhn *et al.*, 1995; Jentschke *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2000; Midwood *et al.*, 2000; Proe *et al.*, 2000; Bucking *et al.*, 2002; Gottlein *et al.*, 2005; Weatherall *et al.*, 2006; Augusto *et al.*, 2011).

van der Heijden *et al.* (accepted FEM) observed similar discrepancies in a 35-yr-old beech plot at the Breuil-Chenué experimental site (Burgundy, France). Computed nutrient budgets over 2003-2008 were negative for Mg and Ca (-0.8 kg.ha⁻¹.yr⁻¹ and -3.1 kg.ha⁻¹.yr⁻¹ respectively) and soil exchangeable Mg and Ca pools were very low in 2001 (33 kg.ha⁻¹ and 61 kg.ha⁻¹). However, foliar Ca concentrations were close to optimal levels (Bonneau, 1995) and remained stable over the study period. Foliar Mg concentrations were below deficiency levels and

remained stable. Finally, no forest decline symptoms were observed. For numerous reasons, in forest ecosystems on base-poor soils, internal cycling, input and output fluxes are difficult to measure with conventional approaches. Because each flux contributes almost equally to soil fertility, no flux may be neglected. The error potential is thus high. Measuring nutrient pool size change is also difficult because spatial variability exceeds nutrient pool size change (van der Heijden *et al.*, accepted FEM). Validating computed fluxes and nutrient budgets is thus often challenging in base poor soils.

We hypothesize that soil exchangeable Mg and Ca pools did not decrease over the 2001-2012 period and that computed nutrient budgets are thus erroneous. To test our hypothesis, we combined i) an *in situ* ecosystem-scale tracing experiment using ^{26}Mg and ^{44}Ca in this plot and ii) the use of the isotopic dilution technique. The main objective of the present study was to determine the fate of magnesium and calcium rainfall inputs in the forest ecosystem. For this purpose, Mg and Ca isotopic composition of the different ecosystem compartments was measured: tree biomass, litter-layer, soil exchangeable pool and soil microbial biomass.

Material and methods

Study site

The experimental site of Breuil-Chenue forest (hereafter named Breuil-Chenue site) is located in the Morvan Mountains, Burgundy, France (latitude 47°18'10", longitude 4°4'44"). The elevation is 640 m, the annual rainfall 1180 mm, the mean annual potential evapo-transpiration (PET) 750 mm and the mean annual temperature 9°C (computed over the period 2006-2010). The soil is a sandy Alcricisol (Alumic Cambisol; WRB FAO) displaying micro-podzolisation features in the upper mineral horizon (Ranger *et al.*, 2004). The soil parent material is granite, containing 23.5% quartz, 44% K-feldspar, 28.5% plagioclase, 1.6% biotite and 1.6% muscovite (Mareschal, 2008). In 1975, part of the native forest (coppice with standards) located on a homogeneous soil type was clear-cut, heaving swathing was carried out. Effectively, all brash and the humus layer were removed from the plot. Plots covering 1000 m² were planted with different species in 1976. A plot of native forest was left un-cut.

The present study focused on the beech plot (*Fagus sylvatica* L.). The humus type in this plot was described in 2003 as a mesomull (Brethes *et al.*, 1995): the OL-layer was 0.5 to 1cm thick, the OF-layer was very thin and discontinuous and no OH-layer was observed (Moukoui, 2006). The humus layer (hereafter referred to as the litter layer) represented 22 000 kg.ha⁻¹ of dry matter, 12 kg.ha⁻¹ of Mg and 54 kg.ha⁻¹ of Ca. This litter layer represented 22 000 kg.ha⁻¹ of dry matter, 12kg.ha⁻¹ of Mg and 54 kg.ha⁻¹ of Ca. Soil chemical properties were measured from 16 soil profiles (0 to 70cm depth) collected in 2001 as detailed below. A description of soil properties is given in Table VIII-1.

This site was selected for the multi-isotopic tracing experiment (described below) for the following reasons:

- Conventional and isotopic approaches to study nutrient cycling may be compared at this site. Indeed, the site has been intensively monitored since 2002 as described below and nutrient fluxes and input-output budgets have been computed (van der Heijden *et al.*, accepted FEM).

- Mg and Ca pools in the ecosystem were very low: the application of a small amount of ^{26}Mg and ^{44}Ca enriched material may be highly labeled these pools.
- Nutrient pools in the soil at this site are very low. However, this is not reflected in tree nutrition and growth.
- Mg and Ca pools in the ecosystem were very low: the application of a small amount of ^{26}Mg and ^{44}Ca enriched material may be highly labeled these pools.

Horizon	Depth <i>cm</i>	Bulk density $\phi < 2\text{mm}$	Soil Texture			C <i>g.kg⁻¹</i>	C/N	Soil cationic exchange capacity			
			Sand %	Silt %	Clay %			ECEC <i>cmolc.kg⁻¹</i>	BS %	Mg <i>cmolc.kg⁻¹</i>	Ca <i>cmolc.kg⁻¹</i>
A1/E	0-5	0.50	57.6	21.8	20.6	72.6	18.0	8.66	19.4	0.23	0.54
A1-A1/Bp	5-10	0.64	60.2	21.5	18.4	46.1	18.1	7.23	10.9	0.13	0.15
Sal 1	10-15	0.67	58.0	23.6	18.4	34.2	18.1	5.43	7.9	0.08	0.07
Sal 2	15-25	0.89	60.0	24.1	16.0	23.3	17.9	4.08	5.8	0.04	0.02
Sal 2	25-40	0.90	57.8	24.7	17.5	14.0	17.1	3.13	7.4	0.03	0.02
Sal 3	40-55	1.08	55.7	25.8	18.5	-	-	3.11	8.1	0.02	0.01
II Sal 4	55-70	1.05	57.3	25.3	17.5	-	-	3.32	8.1	0.03	0.02

Table VIII-1 : Breuil-Chenu experimental site soil description. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2mm diameter (mass of soil particles smaller than 2mm/total volume of soil). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC).

Experimental design and conventional approaches

Data collection

In 2001, 16 soil profiles were sampled in the beech plot (Figure VIII-3). Soil samples were sieved (2 mm) and air-dried before analysis. Fine earth bulk density and soil granulometric distribution was measured. Fine earth mineralogy was determined by X-ray (Siemens D5000) after digestion of the organic fraction by hydrogen peroxide and separation of the granulometric fractions (Mareschal, 2008). Soil exchangeable cations were extracted with two consecutive 1h-long extractions using KCl (1 mol.L⁻¹). Sample Mg, Ca and K concentrations in samples were analysed by ICP-AES (Jobin-Yvon 180 Ultrac). Soil carbon and nitrogen content was analysed with an elementary analysis system (Thermo Quest NCS 2500).

Humus samples (16 replicates) were collected in 2001 using 16.5 x 10.5 x 7.5 cm frames. Humus dry mass (g.m⁻²) was measured for all 16 replicates. Nutrient content was measured for 8 replicates: C and N content was measured (Thermo Quest NCS 2500); P, Mg, Ca and K content was determined by ICP-AES after sample digestion with 50% nitric acid.

An automatic weather station situated in a clearing at the site recorded daily rainfall and potential evapotranspiration (Penmann-Monteith formula). Bulk precipitation was collected with a funnel at the top of a 12 meter high antenna at the weather station and with a PEHD bucket in a clearing 500 m from the site. Throughfall was collected with four two-meter-long PEHD gutters covering in total 1.55 m². Soil solutions were monitored with ceramic tension-cup lysimeters (TCL; Oikos Umweltanalytik GBR, Ceramic P80, porosity 45 µm, alumina-

silica), with an applied pressure of 0.6 bars, at 15, 30 and 60cm depth (4 replicates/depth). Solutions were collected every 28 days and stored in 60mL polypropylene bottles at 4°C. Mg and Ca concentrations in samples were measured by ICP-AES (Jobin-Yvon 180 Ultrace). Time domain reflectometry (TDR) probes monitored the soil volumetric water content at 15, 30 and 60 cm (5 replicates at each depth; measurement time step: 2h).

Nutrient pools in above-ground tree organs were determined following a procedure based on (i) stand inventories every year from 2001 to 2007 (all trees in the beech plot were measured in circumference at breast height, $\text{Circ}_{1.30}$), (ii) a destructive sampling of trees distributed over the whole spectrum of inventoried $\text{Circ}_{1.30}$ classes in 2002, (iii) fitting total above-ground mineralmass allometric equations, and (iv) the quantification of the stand biomass and nutrient content on a per hectare basis by applying the fitted equations to each stand inventory.

Mg and Ca inputs and outputs in 2010-2011

Mg and Ca inputs and outputs were calculated over 2003-2009 in a previous study (van der Heijden et al., accepted FEM). We computed here these fluxes over the 2010-2011 to extend the period following the same methodology in order to compute Mg and Ca budgets and estimate soil nutrient pool size change over 2003-2011.

Atmospheric wet deposition was calculated as the mean deposition in bulk rainfall measured at the weather station antenna and the nearby clearing. Base cation dry atmospheric deposition was estimated using the equations defined by (Ulrich, 1983). Anion dry deposition was computed from the difference between bulk rainfall and throughfall plus stemflow chemical composition. If the computed values were negative, dry deposition was set nil. The mineral weathering flux was estimated with the geochemical model PROFILE (Sverdrup and Warfvinge, 1988) calibrated with the soil solution concentrations and fine earth (soil particles smaller than 2mm diameter) mineralogy (Mareschal, 2008). Mineralmass allometric equations were established in 2001 with 14 sampled trees. Net Uptake was calculated by applying these equations to forest inventories (tree circumference measured at breast height) in 2010, 2011 and 2012. Finally, the leaching flux at 60cm depth was estimated by multiplying measured tension-cup lysimeter concentrations with the modelled water drainage flux (van der Heijden et al., accepted Geoderma).

Multi-isotopic tracing experiment design

Application of the stable isotope tracers

A subplot of the beech plot (hereafter named tracing plot) was equipped in 2009 to carry out a tracing experiment in April 2010. The plot covered 80 m² and was monitored during the two following years as detailed below. The tracing solution (350ppm Mg; 200ppm Ca) was made up by dissolving enriched ^{26}MgO (99.25 atom% ^{26}Mg) and $^{44}\text{CaCO}_3$ (96.45atom% ^{44}Ca). Twenty liters of the tracing solution were sprayed on the ground of the tracing plot representing a 0.25 mm rainfall event. 16 mm of deionised water were sprayed on the tracing plot over a period of 8 hours so as to simulate a natural rainfall event. To avoid a second application of tracer from litterfall, at each fall, all litterfall was collected by setting nets around each tree. Litterfall was replaced by fresh litter collected in the second 35 year-old beech plot of the Breuil-Chenué site.

Isotope ratio analysis and notation

$^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ isotope ratios were measured with ICP-MS (Bruker 820MS) following isotope analysis methods described by van der Heijden *et al.* (accepted Plant and Soil). Measured isotopic compositions of samples are expressed with the absolute value of the isotope ratio ($^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) or in permil deviations relative to the Mg and Ca reference ratios (DSM3 (Galy *et al.*, 2003) and NIST SRM 915a respectively):

$$\delta^{26/24}\text{Mg} = \left\{ \left(\frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3}} - 1 \right\} \times 1000 \quad (1)$$

$$\delta^{44/40}\text{Ca} = \left\{ \left(\frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{sample}} / \left(\frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \right)_{\text{NIST915a}} - 1 \right\} \times 1000 \quad (2)$$

To account for ^{26}Mg and ^{44}Ca applied tracers in each ecosystem compartment, it is necessary to distinguish ^{26}Mg and ^{44}Ca present naturally in Mg and Ca pools from ^{26}Mg and ^{44}Ca present due to the application of the tracers. Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca in samples was calculated assuming that natural isotopic composition (control isotopic composition) was 0‰ for both Mg and Ca:

$$\text{excess}(^yX) = [X]_{\text{sample}} \times (\% ^yX_{\text{sample}} - \% ^yX_{\text{nat}}) \quad (3)$$

where $\text{excess}(^yX)$ is the excess of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) due to the application of the tracer in the sample, $[X]_{\text{sample}}$ the concentration or total amount of total element (Mg or Ca) in the sample, $\% ^yX_{\text{sample}}$ the atom percent of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) in the sample and $\% ^yX_{\text{nat}}$ the atom percent of the tracer isotope (^{26}Mg or ^{44}Ca) at natural abundance (assumed 0‰). Atom percent of the tracer isotopes are calculated as follows:

$$\% ^{26}\text{Mg} = \frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{1 + ^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg} + ^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}} \quad (4)$$

$$\% ^{44}\text{Ca} = \frac{^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}}{1 + ^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca} + ^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}} \quad (5)$$

where $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ are the measured ratios in samples, $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$, $^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, $^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, $^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ and $^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ were assumed to be constant and equal to terrestrial values: 0.1266 for $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$, 6.677×10^{-3} for $^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, 1.3926×10^{-3} for $^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, 4.1262×10^{-5} for $^{46}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ and 1.929×10^{-3} for $^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ (Hoefs, 2009).

^{26}Mg and ^{44}Ca tracers in the ecosystem

Measuring tracer in the litter and soil layers

Four soil profiles were sampled with a cylindrical corer at the end of March 2012 to measure the Mg and Ca isotopic composition of the litter-layer, the soil exchangeable pools and microbial biomass. The litter-layer was collected directly above the four sampled soil profiles. Litter-layer samples were oven-dried (65°C), milled and digested with 50% nitric acid. Sampled soil profiles were divided into 5 cm-thick layers down to 60cm depth. Exchangeable Mg and Ca (Mg_{exch} and Ca_{exch}) were measured after two consecutive extractions: 7.5 g of field fresh soil was

shacked with 50mL of 1 mol.L⁻¹ ammonium acetate for 1h then centrifuged. The supernatant was collected after each extraction and mixed together before being filtered.

Soil microbial biomass ^{26}Mg and ^{44}Ca ($^{26}\text{Mg}_{mic}$ and $^{44}\text{Ca}_{mic}$) were measured using a chloroform fumigation extraction (CFE) procedure (Saggar et al., 1981; Brookes et al., 1982; Brookes et al., 1985; Vance et al., 1987; Sparling and West, 1988; Lorenz et al., 2010): 7.5 g of field-fresh soil was weighed in glass vials and fumigated with chloroform for 24h. Unfumigated samples served as controls. Fumigated samples were extracted following the same protocol as CEC extractions (detailed above). Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca was computed for both fumigated and unfumigated samples with equation (3) and (4). Mg_{mic} , Ca_{mic} , $^{26}\text{Mg}_{mic}$ and $^{44}\text{Ca}_{mic}$ were calculated based on 35°C oven-dry soil by subtracting unfumigated soil extractions (Mg_{exch} and Ca_{exch}) from fumigated soil extractions. Fumigated extractions were carried out on soil samples in the 0-30cm soil layer and for samples collected from April 2010 to March 2012. Differences between fumigated and unfumigated extractions for total element (Mg, Ca and K) and isotope tracers (^{26}Mg and ^{44}Ca) were tested with an ANOVA test. Tracer pools in each compartment were computed from the measured isotope enrichment in each compartment and the total element (Mg and Ca) pool size.

Immobilization of ^{26}Mg and ^{44}Ca in tree biomass

In February 2012, a light thinning was carried out in the tracing plot and five trees were cut to measure ^{26}Mg and ^{44}Ca total uptake during the two years after the tracing experiment. The trunk of each felled tree was cut into one-meter-long logs and each log was weighed (fresh weight), branches were separated according to their diameter and their height in the tree canopy (top, middle and bottom) and the fresh weight of each compartment was measured. A set of samples from each compartment were used to determine biomass water content: from the difference between fresh weight and 65°C oven-dry weight. Another set of samples from each compartment was oven-dried (65°C), milled and digested in 50% nitric acid. Excess ^{26}Mg and ^{44}Ca was computed for each tree and each compartment with equation (3). Stumps were not removed during the thinning to avoid soil disturbances. Root tracer concentration and biomass was thus not available. Root biomass in the Breuil-Chenué beech plot was estimated using biomass allometric equations fitted with root biomass data from a 25 year-old beech stand in Brittany, France (Legout, 2008). Tracer immobilisation in the root biomass was estimated by multiplying predicted root biomass with measured tracer concentrations in the stump. Total immobilized tracer was then calculated for each tree and allometric equations using tree circumference at breast-height were fitted to the data.

Applying the isotopic dilution technique to the whole-ecosystem to estimate exchangeable Mg and Ca pools in 2012

Principle

To compute isotopic tracer recovery in the soil, knowledge of soil exchangeable Mg and Ca pool size is necessary (equation 3). Soil Mg and Ca pools were measured in 2001 but nutrient budgets suggest that Mg and Ca depletion has occurred since (van der Heijden et al., accepted

FEM). Soil Mg and Ca pool size change between 2001 and 2012 was assessed with the isotopic dilution technique.

The isotopic dilution technique is relatively straight forward. The studied pool is spiked with a given isotope and the concentration of that isotope is measured in that pool. The dilution of the initial isotope spike is then used to measure the size of the pool. The difficulty in ecosystem studies is that ecosystems are composed of many different compartments which are in interaction. The isotopic dilution over the whole ecosystem can only be estimated by averaging measured isotope enrichments in each compartment weighted by the total element pool size of each compartment. The difficulty lies in the fact that the total element pool sizes of each compartment are the unknowns in the equation.

Mg and Ca pool sizes of each compartment were measured in 2001 (litter layer, soil exchangeable and tree biomass pools). During the 2003-2008 period, input and output fluxes were monitored and nutrient budgets were calculated. By applying the mean annual Mg and Ca budget to the period 2001-2012, Mg and Ca pools in 2012 may be estimated (Figure VIII-1). The isotopic dilution technique was used to test if Mg and Ca pools in the soil have changed over the 2001-2012 period following the trends predicted by nutrient budgets computed in the beech plot (van der Heijden et al., accepted FEM).

For each hypothesis (detailed below), a theoretical and experimental isotope enrichment for the whole ecosystem (soil, litter layer and tree biomass) were calculated (Figure VIII-2) using the same nutrient pools in the different ecosystem compartments for both isotope enrichments. The theoretical isotope enrichment was computed as the mixing of the initially applied ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers with Mg and Ca whole-ecosystem pools respectively. The experimental isotope enrichment was computed as the average isotope enrichment of the different ecosystem compartments weighted by the Mg and Ca pool sizes of each compartment.

Hypotheses tested

Two hypotheses were tested (Figure VIII-1):

- (A) Soil exchangeable Mg and Ca pools have not decreased over the 2001-2012 period
- (B) Soil exchangeable Mg and Ca pools have decreased over the 2001-2012 following the trend suggested by nutrient input output budgets (respectively $-0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$ and $-3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$)

Hypothesis A implies that computed nutrient budgets are erroneous and should be at equilibrium instead of being negative. For this scenario, ecosystem inputs (atmospheric deposition and weathering) were increased to obtain Mg and Ca budget equilibrium.

The absolute difference between theoretical and experimental isotope enrichments was noted Δ_{enrich} . When theoretical and experimental isotope enrichments agree (Δ_{enrich} inferior to experimental isotope enrichment uncertainty (noted ϵ) as detailed below), the hypothesis tested (A or B) cannot be rejected. However, when theoretical and experimental isotope enrichments disagree, the hypothesis is rejected. If the theoretical exceeds the experimental isotope

enrichment, this suggests that the Mg or Ca pools in the tested hypothesis are underestimated and conversely.

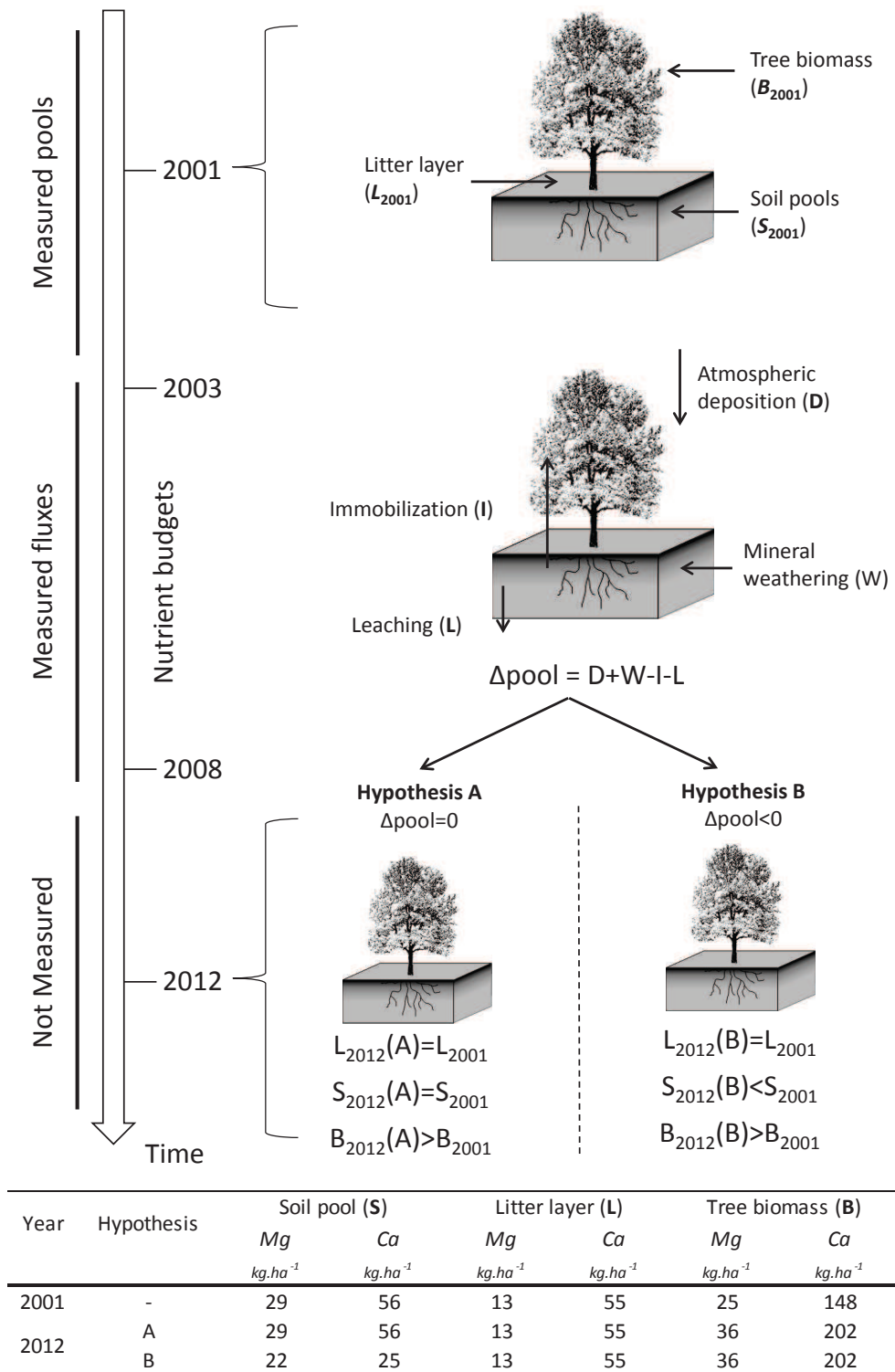


Figure VIII-1: Schematic description of the two hypotheses tested: (A) Soil exchangeable Mg and Ca pools have not decreased over the 2001-2012 period and (B) Soil exchangeable Mg and Ca pools have decreased following the trend suggested by nutrient input output budgets. Mg and Ca pool size in the different ecosystem compartments (soil, Litter-layer and tree biomass) in 2001 and in 2012 according to each hypothesis is given in the table.

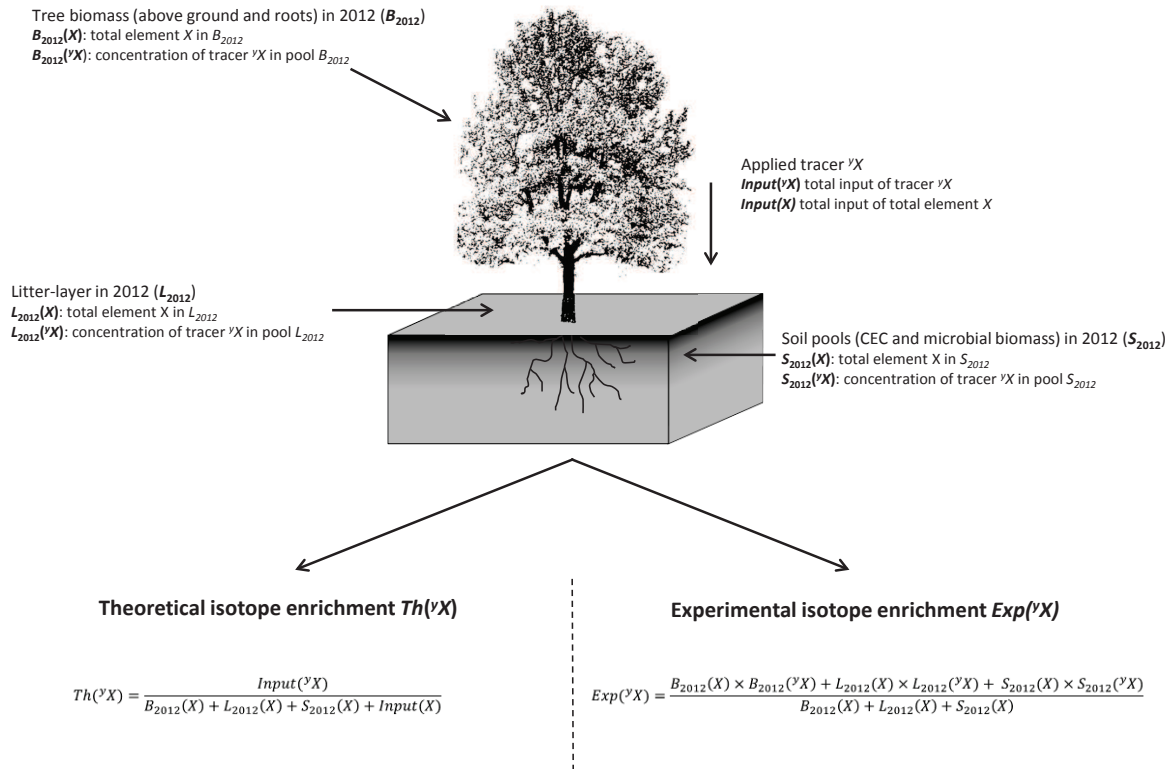


Figure VIII-2: Schematic description of the theoretical and experimental isotope enrichment calculation methodology

Tracer recovery and uncertainty in tracer pool estimation

Tracer recovery was estimated by summing tracer pools of each ecosystem compartment (litter-layer, soil exchangeable, soil microbial biomass and tree biomass). Uncertainty in the litter-layer, soil exchangeable and microbial biomass ^{26}Mg and ^{44}Ca pools was estimated from spatial variability (standard deviation of the four soil profiles sampled) of measured isotope enrichment. Uncertainty in the allometric equation predicting ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake by trees was assessed using Monte-Carlo simulations. Fitted parameters were assumed to follow a normal distribution. The mean and standard deviation of these distributions were determined from parameter estimates (Table VIII-2). For each iteration, equation parameters were randomly selected within their distribution and equations were applied to the beech plot inventory to compute total tracer uptake. Monte-Carlo simulations were run for 1000 iterations and uncertainty in the allometric equations was estimated from the standard deviation of the distribution of the 1000 predictions.

To assess uncertainty in total tracer recovery estimates, a similar procedure was applied. At each iteration, tracer uptake was predicted with the allometric equation (randomly selected parameters as described above) and a randomly selected value of ^{26}Mg or ^{44}Ca isotope enrichment in the litter-layer, soil exchangeable and microbial biomass was used to compute ^{26}Mg or ^{44}Ca pools in each of these compartments. We assumed that ^{26}Mg and ^{44}Ca isotope enrichments followed a normal distribution (the mean and standard deviation of these distributions were determined from the four soil profile replicates). All ^{26}Mg or ^{44}Ca pools (litter-layer, soil exchangeable, microbial and tree biomass) were then summed and uncertainty was estimated from the standard deviation of the distribution of the 1000 predictions.

Depth	Mg	Ca	K	$\delta^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$	$\delta^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$
0-5	>0.0001	0.4935	0.0128	0.0188	0.8661
5-10	>0.0001	0.8304	>0.0001	0.0008	0.5255
10-15	>0.0001	0.3308	0.0080	0.1286	0.7773
15-20	0.0015	0.8414	0.3897	0.4179	0.5844
20-25	0.0013	0.5582	0.2181	0.8812	0.1316
25-30	0.0066	0.5851	0.1990	0.8469	0.9452

Table VIII-2: Differences between fumigated and unfumigated extractions for total element (Mg, Ca and K) and isotopic composition ($^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) tested by ANOVA for soil samples collected from 04/2010 to 04/2012. The p-value of the ANOVA tests is presented for each element and for each depth from 0 to 30cm depth.

Results

Base cation microbial immobilization

Throughout the study period (April 2010 to March 2012), the comparison of fumigated and unfumigated soil CEC extractions (Figure VIII-3) evidenced a high immobilization of Mg in soil micro-organisms. Indeed, Mg levels in fumigated samples were on average 2.2 fold higher than in unfumigated samples. ANOVA tests showed that the differences were statistically significant for all depths down to 30cm (Table VIII-2). K levels in fumigated samples were also higher (1.4 fold on average) than in unfumigated samples. However, differences were only significant in the 0-15cm soil layer. No difference was observed between fumigated and unfumigated Ca extractions.

Isotopic composition of fumigated-unfumigated extractions was also compared (Figure VIII-3). Isotopic composition of unfumigated extractions tended to be more enriched in ^{26}Mg than fumigated extractions. The difference was statistically significant for the 0-10cm layer. The ^{26}Mg enrichment of unfumigated samples was on average 1.6 fold higher than fumigated samples for the 0-10cm layer. No difference was observed between the isotopic composition of fumigated and unfumigated Ca extractions.

Tracer	Parameters	Value	SD	Pr > t	R ²
^{26}Mg	Intercept	-1.83E+00	4.91E-01	0.065	
	BHC	1.36E-02	1.89E-03	0.019	0.963
^{44}Ca	Intercept	-4.28E-01	8.94E-02	0.041	
	BHC	3.19E-03	3.44E-04	0.011	0.977

Table VIII-3: Linear regression model parameters for the allometric equations predicting whole-tree ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake (mmol) from tree circumference at breast height (mm).

Tracer Immobilization in tree biomass

Total immobilized ^{26}Mg and ^{44}Ca in each sampled tree (above and below-ground organs) was measured and plotted against tree circumference at breast height (Figure VIII-4). For both ^{26}Mg and ^{44}Ca , the relation between tracer immobilization and tree circumference was linear. For one sampled tree, both ^{26}Mg and ^{44}Ca immobilization was particularly low and did not follow the main linear relation. This sampled tree was considered as an outlier when fitting linear

models to predict tracer uptake (Table VIII-3). ^{26}Mg and ^{44}Ca immobilization in the whole-tree (above and below-ground organs) was positively correlated to tree circumference.

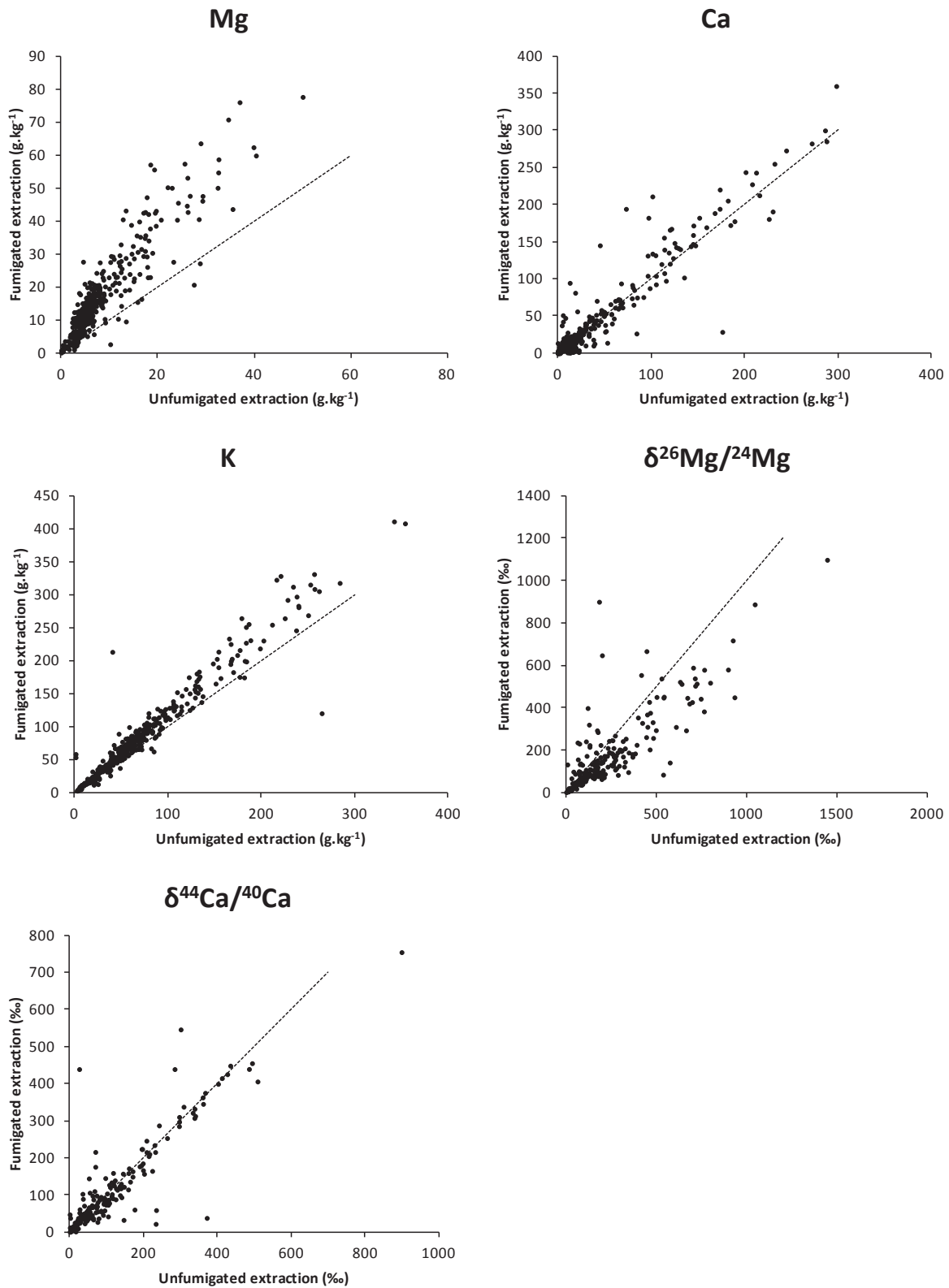


Figure VIII-3: Differences between fumigated and unfumigated soil extractions for total element (Mg, Ca and K), expressed in g.kg⁻¹, and stable isotope tracers (^{26}Mg and ^{44}Ca) expressed in ‰. The dotted line is the 1:1 line.

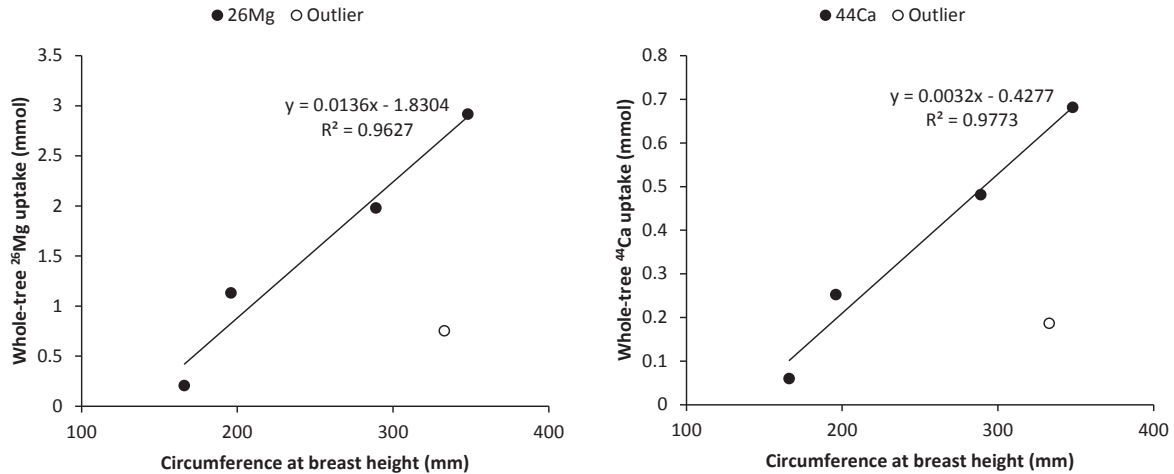


Figure VIII-4: Relation between whole-tree ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake (expressed in mmol of tracer) during the two years following the application of the tracer and tree circumference at breast height (mm). One sampled tree presented abnormally low tracer uptake and was considered as an outlier to fit allometric equations.

Mg and Ca pool size change tested with the isotopic dilution technique

The different hypotheses were tested with the isotopic dilution technique (Figure VIII-5). Theoretical and experimental isotope enrichments were considered significantly different if Δ_{enrich} was greater than experimental isotope enrichment uncertainty (ϵ). On the one hand, when assuming constant soil exchangeable Mg pools over time (nutrient budgets at equilibrium, hypothesis A), Δ_{enrich} was significant (Figure VIII-5): $\Delta_{\text{enrich}} = -19.3\text{‰}$ and $\epsilon = 10.1\text{‰}$. When assuming Mg depletion from the soil exchangeable pool following the trend suggested by computed nutrient budgets (hypothesis B), theoretical and experimental isotope enrichments were very similar ($\Delta_{\text{enrich}} = -2.8\text{‰}$ and $\epsilon = 10.9\text{‰}$). On the other hand, theoretical and experimental isotope enrichments agreed when soil exchangeable Ca pools were assumed constant over time (hypothesis A) (Figure VIII-5): $\Delta_{\text{enrich}} = -0.6\text{‰}$ and $\epsilon = 15.0\text{‰}$. Theoretical and experimental isotope enrichments were significantly different if Ca pools were assumed to decrease following the computed nutrient budget trend (hypothesis B): $\Delta_{\text{enrich}} = +19.8\text{‰}$ and $\epsilon = 11.5\text{‰}$.

^{26}Mg and ^{44}Ca tracer recovery

Tracer recovery was computed for each compartment and for the whole ecosystem, and for each hypothesis tested. However, only the results of tracer recovery for the A and the B hypothesis are presented for ^{44}Ca and ^{26}Mg respectively since hypothesis B was rejected for Ca and hypothesis A was rejected for Mg as detailed above.

^{26}Mg and ^{44}Ca recovery in each ecosystem compartment was assessed in March 2012 (Figure VIII-6). Only 27.4% and 20.5% of the applied ^{26}Mg and ^{44}Ca respectively were immobilized in tree biomass (above-ground and root biomass). Most of the accounted ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer recovery was found in the soil profile (litter-layer, exchangeable and microbial biomass pools) 74.2% and 80.0%. The litter-layer still contained 8.0% and 32.8% and the microbial biomass immobilized a high amount of ^{26}Mg (16.7%) while $^{44}\text{Ca}_{\text{mic}}$ was nil. Finally, the soil exchangeable pool (0-60cm) contained 49.5% and 47.1% of applied ^{26}Mg and ^{44}Ca . The

investigation of the different ecosystem compartments (litter-layer, exchangeable, microbial and tree biomass) accounted for 102.0% and 100.2% of the applied ^{26}Mg and ^{44}Ca .

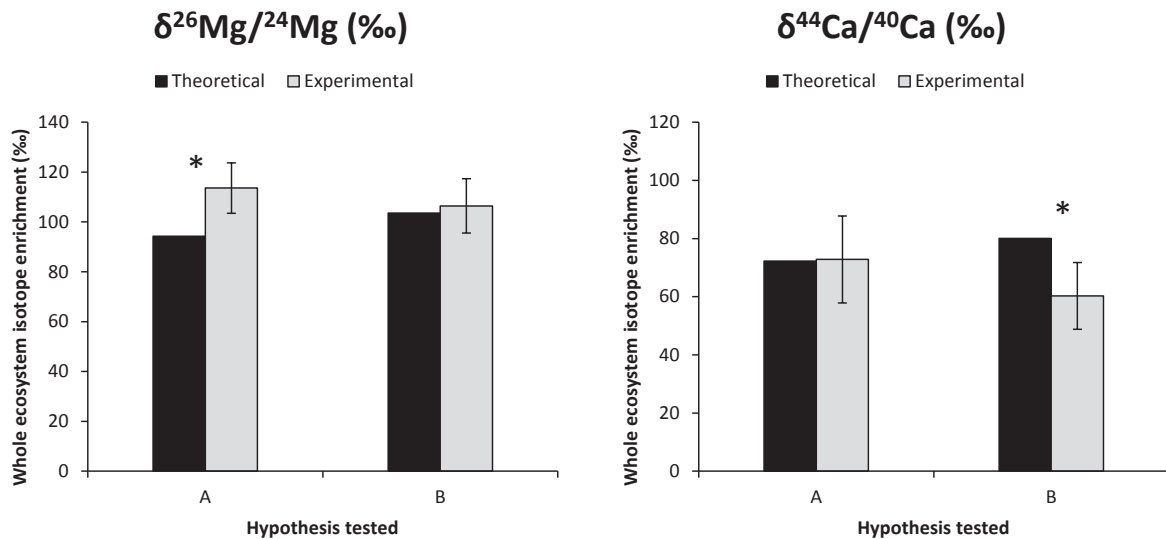


Figure VIII-5: Hypotheses testing with the isotopic dilution technique. Theoretical and experimental isotope enrichments were computed for the whole ecosystem (Litter-layer, soil and tree biomass) according to different hypotheses on Mg and Ca pool change since 2001. Error bars are experimental isotope enrichment uncertainty estimated with Monte-Carlo simulations. (*) notes a significant difference between theoretical and experimental isotope enrichments.

Discussion

Soil exchangeable Mg and Ca pool change over time

Although the isotopic dilution technique is a well-known technique and has been applied to quantify many different elements in many different systems (von Hevesy and Hofer, 1934; Forbes and Perley, 1951; Willison et al., 1998; Cookson and Murphy, 2004; Achat et al., 2009a; Achat et al., 2009b; Stroud et al., 2011), we present here the first isotopic dilution technique applied to the whole ecosystem to assess Mg and Ca pool size change. This enabled to determine whether soil exchangeable Mg and Ca pools were depleted as predicted by nutrient budgets (van der Heijden et al., accepted FEM). Our results show that Mg was depleted from the soil exchangeable pool between 2001 and 2012 and Mg depletion calculated with nutrient budgets (i.e. $-0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$) was validated by the isotopic dilution: theoretical and experimental ^{26}Mg isotope enrichments were very similar for hypothesis B (Figure VIII-5). However, the isotopic dilution results suggest that the soil exchangeable Ca pool has remained constant since 2001 and was not depleted as nutrient budgets suggest (i.e. $-3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$). If Ca nutrient budgets are at equilibrium, this implies that either Ca inputs to the soil are underestimated, or Ca outputs are over-estimated, or a combination of these factors.

Hypothesis A as presented in Figure VIII-5 was calculated assuming that Ca budget equilibrium was obtained by increased Ca-inputs (atmospheric deposition and mineral weathering). Hence, an underestimation of these inputs may explain the discrepancy between Ca-budgets and change in the soil exchangeable Ca pool. However, Ca budget equilibrium may also be explained by an overestimation of Ca-outputs (immobilization in tree biomass and Ca-

leaching). An over-estimation of the leaching flux ($1.4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$) cannot by itself equilibrate Ca budgets. Theoretical and experimental isotope enrichments were computed for the hypothesis A assuming that immobilization in tree biomass was overestimated (data not shown). Δ_{enrich} was very small (0.6‰) and inferior to uncertainty (16.1‰). The soil exchangeable Ca pool has remained constant over the 2001-2011 period thus contradicting calculated Ca budgets. The reason for such a discrepancy was not evidenced with the isotopic dilution technique: underestimation of Ca-inputs (atmospheric deposition and/or mineral weathering) or an overestimation of Ca-outputs (immobilization in tree biomass) or a combination of these factors. The midterm monitoring of the tracing plot may enable to investigate these different hypotheses.

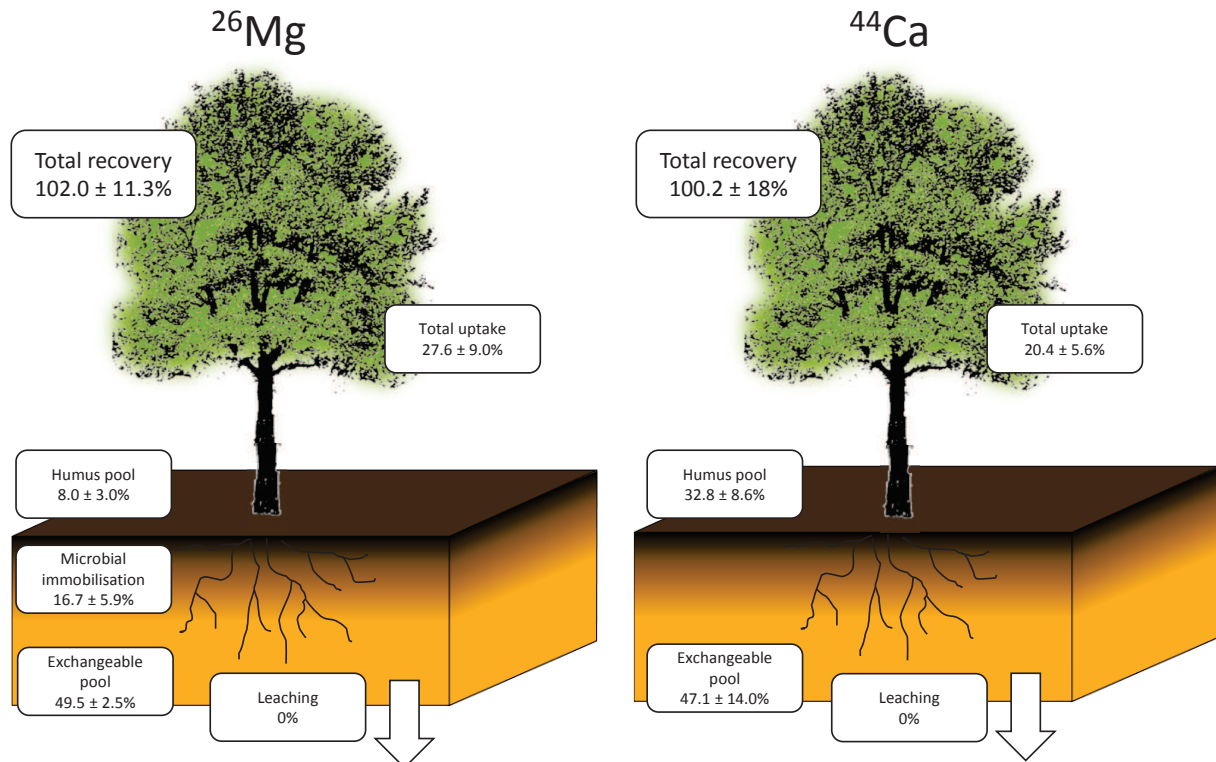


Figure VIII-6: ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer total recovery and tracer distribution in ecosystem compartments two years after the application of tracers. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers are expressed in percentage of the applied tracer (mean \pm standard deviation).

The isotopic dilution technique enabled to validate Mg budgets over 2003-2011. However, Mg depletion may have occurred in the litter-layer and/or in the soil exchangeable pool. A decrease of the soil exchangeable Mg pool is plausible since hypothesis B as presented in Figure VIII-5 was calculated assuming such a decrease. A decrease of Mg and Ca pools in the litter-layer is unlikely. Indeed, recovery of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the litter-layer the day following the application of tracers (calculated using the Mg and Ca pools in the litter-layer measured in 2001) was close to 100%: respectively $80\pm 19\%$ and $106\pm 36\%$. The Mg and Ca pools in the litter-layer measured in 2001 and used to compute tracer pools in the litter-layer were validated. The spatial variability of ^{26}Mg and ^{44}Ca recovery is mainly due to high spatial variability of nutrient pools in the litter-layer (Bens et al., 2006; Legout et al., 2008). On average ^{26}Mg recovery was below 100%. Indeed it is probable that part of the applied ^{26}Mg leached rapidly from the litter-layer to the topsoil while ^{44}Ca was more efficiently retained in the litter-layer. Many authors have reported such dynamics when studying nutrient release from litter decomposition (MacLean and Wein, 1978; Berg and Staaf, 1987; Blair, 1988). The soil exchangeable Mg pool decreased

over the 2001-2011 period following the trend predicted by Mg budgets ($-0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$). Soil Mg pools in 2012 were thus $\sim 22 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Figure VIII-1).

The isotopic dilution technique enabled to validate Mg budgets over 2003-2011. However, Mg depletion may have occurred in the Litter-layer and/or in the soil exchangeable pool. A decrease of the soil exchangeable Mg pool is plausible since hypothesis B as presented in Figure VIII-5 was calculated assuming such a decrease. A decrease of Mg and Ca pools in the Litter-layer is unlikely. Indeed, recovery of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the Litter-layer the day following the application of tracers (calculated using the Mg and Ca pools in the Litter-layer measured in 2001) was respectively $80\pm 19\%$ and $106\pm 36\%$. Spatial variability of nutrient pools in the Litter-layer is high in forest ecosystems (Bens *et al.*, 2006; Legout *et al.*, 2008). It is probable that part of the applied ^{26}Mg leached rapidly from the Litter-layer to the topsoil while ^{44}Ca was more efficiently retained in the Litter-layer. Many authors have reported such dynamics when studying nutrient release from litter decomposition (MacLean and Wein, 1978; Berg and Staaf, 1987; Blair, 1988). The Mg and Ca pools in the Litter-layer measured in 2001 and used to compute tracer pools in the Litter-layer were thus validated. The soil exchangeable Mg pool decreased over the 2001-2011 period following the trend predicted by Mg budgets ($-0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$). Soil Mg pools in 2012 were thus $\sim 22 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Figure VIII-1).

Fate of Mg and Ca tracers in the forest ecosystem

The incorporation of ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers to the biogeochemical cycling of Mg and Ca was surprisingly slow. After two years, only $27 \pm 9\%$ and $20 \pm 5.6\%$ of ^{26}Mg and ^{44}Ca respectively were immobilized in tree biomass. Given low Mg and Ca availability in the soil, rainfall Mg and Ca were expected to be directly and rapidly immobilized in tree biomass. Allometric equations were fitted on a small number of sampled trees (trees were kept for the long-term monitoring of the tracing plot) which did not cover the entire range of tree circumferences in the tracing plot (the thinning was carried in order to favor the larger trees). This may lead to a poor estimation of tracer uptake. However, tracer recovery (Figure VIII-6) after two years ($102\pm 11.3\%$ of ^{26}Mg and $100.2\pm 18.0\%$ of ^{44}Ca) suggests that the estimation of tracer immobilization is correct. Although tracer recovery was close to 100%, uncertainty was high. Tracer recovery after two years also suggests that no leaching of ^{26}Mg and ^{44}Ca from the soil occurred during the two years after the application of the tracers. The litter-layer, soil microbial biomass and the soil cationic exchange capacity proved to be very efficient to retain Mg and Ca inputs.

Mg and Ca retention in the litter-layer and on the soil CEC

Two years after the application, 8.0% and 32.8% of tracer ^{26}Mg and ^{44}Ca was still retained in the litter-layer. The litter-layer has been suggested as a major component of forest soil chemical fertility (Farkaš *et al.*, 2011; van der Heijden *et al.*, accepted FEM) and most especially in base-poor soils. Our results suggest that the litter-layer is not only capable of storing base cations from the litterfall but also very efficiently retains Mg and Ca inputs to the soil (atmospheric deposition, nutrient foliar leaching). The mechanisms of retention are yet unclear. While Mg and Ca may be retained by precipitation of Mg and Ca-oxalate crystals due to fungal activity (Cromack *et al.*, 1979; Connolly and Jellison, 1995; Tait *et al.*, 1999; Gadd, 2007), it is probable that the exchange reactions on the cationic exchange capacity of organic matter is the

main processes (Staaf and Berg, 1982; Lax et al., 1986; Bockheim et al., 1991; Vanwesemael, 1993).

The CEC in the soil profile also strongly retained applied ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers (Figure VIII-6). The greater part of applied ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers were retained in the first 5 cm of the soil profile (data not shown) most probably due to higher organic matter content and its CEC. Calcium was more efficiently retained in the topsoil than Mg (very little excess ^{44}Ca was found below 15 cm depth). This is in agreement with selectivity coefficients for calcium-magnesium exchange on both organic and mineral CEC (Robbins and Carter, 1983; Curtin et al., 1998; DeSutter et al., 2006). Little or no stable isotope tracers were found in depth (60 cm). This also suggests that no leaching of ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers from the soil occurred during the two years after the application of the tracers.

Mg immobilization in soil microbial biomass

The chloroform-fumigation extraction is a well-established method to study nutrient immobilization in soil microbial biomass to study C (Vance et al., 1987; Sparling and West, 1988; Tate et al., 1988), N (Brookes et al., 1985), P (Brookes et al., 1982) and S (Saggar et al., 1981; Castellano and Dick, 1991). Little or no attention has been given to the immobilization of base cations in soil microbial biomass. However, Lorenz *et al.* (2010) showed the importance of the soil microbial biomass immobilization in the cycling of potassium with the chloroform-fumigation extraction.

The chloroform-fumigation extraction was successively applied to forest soils and evidenced immobilized Mg and K in the soil microbial biomass. Chloroform-fumigation extractions may require calibration by spiking soil samples with bacteria and fungi with known Mg and K content to correct for partial recovery of nutrients during the extraction. For instance, Lorenz *et al.* (2010) found potassium microbial biomass conversion constants (k_K) ranging from 0.18 to 0.24. Microbial biomass conversion factors for Mg and K were not determined and immobilized Mg and K in microbial biomass measurements were not corrected. Given that two consecutive extractions were carried out on both fumigated and unfumigated samples, it is likely that Mg and K recovery was close to 100%. Also, the ^{26}Mg budget in March 2012 (102%; Figure VIII-6) was evidence supporting uncorrected measurements of immobilized ^{26}Mg in microbial biomass. Levels of Mg and K in fumigated samples were on average 2.2 and 1.4 fold higher than in unfumigated samples. Soil microbial biomass is potentially an important Mg and K storage pool. Another matter of importance would be to determine whether conventional soil cationic exchange capacity extractions using dry soil account for part of immobilized Mg and K in microbial biomass. This, however, exceeded the scope of the present study.

The isotopic composition of unfumigated and fumigated samples gave insight on the Mg sources in the soil utilized by microbial biomass. Indeed, $\delta^{26}\text{Mg}$ of fumigated samples were below $\delta^{26}\text{Mg}$ of unfumigated samples throughout the study period (Figure VIII-3) indicating that soil microbial biomass was less enriched than the soil exchangeable Mg pool. Soil microbial biomass may immobilize Mg from different sources: a ^{26}Mg -enriched source (soil cationic exchange capacity) and natural abundance sources. These natural abundance sources may include organically bound Mg derived from litterfall and/or weathering of Mg bearing minerals (Calvaruso et al., 2006; Arocena et al., 2011). $\delta^{26}\text{Mg}$ of fine roots in the tracing plot was below

$\delta^{26}\text{Mg}$ of the surrounding soil exchangeable Mg pool (van der Heijden et al., accepted Plant and Soil). This observation may be explained by the lower $\delta^{26}\text{Mg}$ of microbial biomass: the $\delta^{26}\text{Mg}$ of nutrient uptake may be close to the $\delta^{26}\text{Mg}$ of microbial biomass due to mycorrhizal fungi (Jentschke et al., 2000; Kuhn et al., 2000; Jentschke et al., 2001; Bucking et al., 2002).

Conclusion

Our results also show that incorporation of Mg and Ca inputs to the nutrient cycles in the forest ecosystem is very slow even in a base-poor soil where nutrient cycling was expected to be fast to compensate for small Mg and Ca pools. However, Mg and Ca nutrient cycles were proven to be very conservative. Tracers were strongly retained in the litter-layer, the soil cationic exchange capacity and immobilized in the soil microbial biomass and it is most likely that no ^{26}Mg or ^{44}Ca was lost from leaching at 60cm depth.

We present the first in situ isotopic dilution technique using ^{26}Mg and ^{44}Ca at the ecosystem scale. This technique was proven to be an efficient method to assess Mg and Ca pool size change in the different ecosystem compartments.

Change in the soil exchangeable Mg pool was evidenced. Given high spatial variability, such a small change ($0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$) could not have been evidenced with conventional soil exchangeable pool comparisons. As soil exchangeable Mg pools decrease with time, concerns regarding the sustainability of such forests on base-poor soils are rising. Will Mg pools further decrease with time or will a compensation mechanism be triggered to buffer Mg depletion?

We present evidence that conventional nutrient input-output budgets may largely over-estimate Ca depletion from the soil. To determine the sources of error in the Ca budgets specific experiments are required to test the different hypotheses: under-estimated inputs (atmospheric deposition, mineral weathering, and root nutrient uptake in deep soil layers) or over-estimation outputs (nutrient immobilization in tree biomass).

Understanding Mg and Ca residence times in the different ecosystem compartments is essential to understand ecosystem resilience to changes such as decreasing base-cation atmospheric deposition or intensified silvicultural practices. For this purpose, midterm monitoring of the ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers in the tracing plot is essential.

Reference list

- Achat, D.L., Bakker, M.R., Augusto, L., Saur, E., Dousseron, L., Morel, C., 2009a. Evaluation of the phosphorus status of P-deficient podzols in temperate pine stands: combining isotopic dilution and extraction methods. *Biogeochemistry* 92, 183-200.
- Achat, D.L., Bakker, M.R., Morel, C., 2009b. Process-Based Assessment of Phosphorus Availability in a Low Phosphorus Sorbing Forest Soil using Isotopic Dilution Methods. *Soil Sci Soc Am J* 73, 2131-2142.
- Arocena, J.M., Velde, B., Robertson, S.J., 2011. Weathering of biotite in the presence of arbuscular mycorrhizae in selected agricultural crops. *Applied Clay Science*.
- Augusto, L., Zeller, B., Midwood, A.J., Swanston, C., Dambrine, E., Schneider, A., Bosc, A., 2011. Two-year dynamics of foliage labelling in 8-year-old *Pinus pinaster* trees with (15)N, (26)Mg and (42)Ca-simulation of Ca transport in xylem using an upscaling approach. *Ann For Sci* 68, 169-178.
- Barrett, K., Hjellbrekke, A.G., Tarrason, L., Schaug, J., 2000. An evaluation of trends for concentrations in air and precipitation. In: Tarrason, L., Schaug, J. (Eds.), *Transboundary acidification and eutrophication in Europe*, EMEP Summary Report 2000. Norwegian meteorological institute, Oslo, Norway, pp. 41-48.
- Bens, O., Buczko, U., Sieber, S., Huttli, R.F., 2006. Spatial variability of O layer thickness and humus forms under different pine beech-forest transformation stages in NE Germany. *J. Plant Nutr. Soil Sci.-Z. Pflanzenernahr. Bodenkd.* 169, 5-15.
- Berg, B., Staaf, H., 1987. Release of nutrients from decomposing white birch leaves and Scots pine needle litter. *Pedobiologia* 30, 55-63.
- Blair, J.M., 1988. Nutrient release from decomposing foliar litter of 3 tree species with special reference to calcium, magnesium and potassium dynamics. *Plant Soil* 110, 49-55.
- Bockheim, J.G., Jepsen, E.A., Heisey, D.M., 1991. Nutrient dynamics in decomposing leaf litter of 4 tree species on a sandy soil in northwestern Wisconsin. *Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For.* 21, 803-812.
- Bonneau, M., 1995. Fertilisation des forêts dans les pays tempérés. ENGREF, Nancy.
- Bormann, F.H., Likens, G.E., 1967. Nutrient cycling. *Science* 155, 424-429.
- Boxman, A.W., Peters, R.C.J.H., Roelofs, J.G.M., 2008. Long term changes in atmospheric N and S throughfall deposition and effects on soil solution chemistry in a Scots pine forest in the Netherlands. *Environ Pollut* 156, 1252-1259.
- Brethes, A., Brun, J., Jabiol, B., Ponge, J., Toutain, F., 1995. Classification of forest humus forms: a French proposal. *Ann. For. Sci.* 52, 535-546.
- Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil-nitrogen - A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.* 17, 837-842.
- Brookes, P.C., Powlson, D.S., Jenkinson, D.S., 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. Biochem.* 14, 319-329.
- Brumme, R., Meesenburg, H., Bredemeier, M., Jacobsen, C., Schönfelder, E., Meiwes, K.J., Eichhorn, J., 2009. Changes in soil solution chemistry, seepage losses, and input-output budgets at three beech forests in response to atmospheric deposition. In: Brumme, R., Khanna, P.K. (Eds.), *Ecological studies 208 - Functioning and Management of European Beech Ecosystems*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 303-336.
- Bucking, H., Kuhn, A.J., Schroder, W.H., Heyser, W., 2002. The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? *J. Exp. Bot.* 53, 1659-1669.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Frey-Klett, P., 2006. Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1258-1266.
- Castellano, S.D., Dick, R.P., 1991. Modified calibration procedure for the measurement of microbial sulfur in soil. *Soil Sci Soc Am J* 55, 283-285.
- Connolly, J.H., Jellison, J., 1995. Calcium translocation, calcium-oxalate accumulation, and hyphal sheath morphology in the white-rot fungus *Resinicium bicolor*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 73, 927-936.
- Cookson, W.R., Murphy, D.V., 2004. Quantifying the contribution of dissolved organic matter to soil nitrogen cycling using 15N isotopic pool dilution. *Soil Biol Biochem* 36, 2097-2100.
- Cooper, D.M., 2005. Evidence of sulphur and nitrogen deposition signals at the United Kingdom Acid Waters Monitoring Network sites. *Environ Pollut* 137, 41-54.
- Cromack, K., Sollins, P., Graustein, W.C., Speidel, K., Todd, A.W., Spycher, G., Li, C., Todd, R.L., 1979. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biol Biochem* 11, 463-468.

- Curtin, D., Selles, F., Steppuhn, H., 1998. Estimating Calcium-Magnesium Selectivity in Smectitic Soils from Organic Matter and Texture. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 1280-1285.
- DeSutter, T.M., Pierzynski, G.M., Baker, L.R., 2006. Flow-through and batch methods for determining calcium-magnesium and magnesium-calcium selectivity. *Soil Sci Soc Am J* 70, 550-554.
- Ericsson, K., 2004. Bioenergy policy and market development in Finland and Sweden. *Energy policy* 32, 1707-1721.
- Farkaš, J., Déjeant, A., Novák, M., Jacobsen, S.B., 2011. Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca^{2+} in a base-poor forest: A new concept of combining stable ($\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$) and radiogenic (ϵCa) signals. *Geochim Cosmochim* 75, 7031-7046.
- Forbes, G.B., Perley, A., 1951. Estimation of total body sodium by isotopic dilution. I. Studies on young adults. *The Journal of clinical investigation* 30, 558-565.
- Gadd, G.M., 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 111, 3-49.
- Galy, A., Yoffe, O., Janney, P.E., Williams, R.W., Cloquet, C., Alard, O., Halicz, L., Wadhwa, M., Hutcheon, I.D., Ramon, E., Carignan, J., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM980 and new reference materials for magnesium-isotope-ratio measurements. *J Anal Atom Spectrom* 18, 1352-1356.
- Gottlein, A., Heim, A., Kuhn, A.J., Schroder, W.H., 2005. In-situ application of stable isotope tracers in the rhizosphere of an oak seedling. *Eur. J. For. Res.* 124, 83-86.
- Hazlett, P.W., Curry, J.M., Weldon, T.P., 2011. Assessing Decadal Change in Mineral Soil Cation Chemistry at the Turkey Lakes Watershed. *Soil Sci Soc Am J* 75, 287-305.
- Hedin, L.O., Likens, G.E., 1996. Atmospheric dust and acid rain. *Sci Am* 275, 88-92.
- Hoefs, J., 2009. *Stable Isotope Geochemistry*, 6th Edition. Springer-Verlag, Germany.
- Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A.J., Schroder, W.H., Becker, J.S., Godbold, D.L., 2000. The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant Soil* 220, 243-246.
- Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A.J., Schröder, W.H., Godbold, D.L., 2001. Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* 149, 327-337.
- Johnson, C.E., Romanowicz, R.B., Siccama, T.G., 1997. Conservation of exchangeable cations after clear-cutting of a northern hardwood forest. *Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For.* 27, 859-868.
- Johnson, D.W., Todd, D.E., 1998. Harvesting effects on long-term changes in nutrient pools of mixed oak forest. *Soil Sci Soc Am J* 62, 1725-1735.
- Kuhn, A.J., Bauch, J., Schroder, W.H., 1995. Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant Soil* 168-169, 135-150.
- Kuhn, A.J., Schroder, W.H., Bauch, J., 2000. The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots. *Planta* 210, 488-496.
- Laclau, J.P., Ranger, J., Deleporte, P., Nouvellon, Y., Saint-Andre, L., Marlet, S., Bouillet, J.P., 2005. Nutrient cycling in a clonal stand of Eucalyptus and an adjacent savanna ecosystem in Congo 3. Input-output budgets and consequences for the sustainability of the plantations. *Forest Ecol Manag* 210, 375-391.
- Landmann, G., Bonneau, M., 1995. *Forest decline and atmospheric deposition effects in the french mountains*. Springer Verlag, Berlin.
- Lax, A., Roig, A., Costa, F., 1986. A method for determining the cation-exchange capacity of organic materials. *Plant Soil* 94, 349-355.
- Legout, A., 2008. *Cycles Biogéochimiques et bilans de fertilité minérale en hêtraies de plaine*. AGROPARISTECH-ENGREF, Nancy, 281
- Legout, A., Walter, C., Nys, C., 2008. Spatial variability of nutrient stocks in the humus and soils of a forest massif (Fougeres, France). *Ann For Sci* 65, 108-article 108.
- Likens, G.E., Driscoll, C.T., Buso, D.C., 1996. Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. *Science* 272, 244-246.
- Likens, G.E., Driscoll, C.T., Buso, D.C., Siccama, T.G., Johnson, C.E., Lovett, G.M., Fahey, T.J., Reiners, W.A., Ryan, D.F., Martin, C.W., Bailey, S.W., 1998. The biogeochemistry of calcium at Hubbard Brook. *Biogeochemistry* 41, 89-173.
- Lorenz, N., Verdell, K., Ramsier, C., Dick, R.P., 2010. A Rapid Assay to Estimate Soil Microbial Biomass Potassium in Agricultural Soils. *Soil Sci Soc Am J* 74, 512-516.
- MacLean, D.A., Wein, R.W., 1978. Weight loss and nutrient changes in decomposing litter and forest floor material in New Brunswick forest stands. *Canadian Journal of Botany* 56, 2730-2749.

- Mareschal, L., 2008. Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur minéralogie : bilan après 28 ans dans le site expérimental de Breuil (Morvan). Ressources Procédés Produits Environnement, Université Henri Poincaré, Nancy, 328
- Matzner, E., Meiwes, K.J., 1994. Long-term development of element fluxes with bulk precipitation and throughfall in two forested ecosystems of the German Solling area. *J Environ Qual* 23, 162-166.
- McLaughlin, J.W., Calhoun, E.B.W., Gale, M.R., Jurgensen, M.F., Trettin, C.C., 2011. Biogeochemical cycling and chemical fluxes in a managed northern forested wetland, Michigan, USA. *Forest Ecol Manag* 261, 649-661.
- McLaughlin, J.W., Phillips, S.A., 2006. Soil carbon, nitrogen, and base cation cycling 17 years after whole-tree harvesting in a low-elevation red spruce (*Picea rubens*)-balsam fir (*Abies balsamea*) forested watershed in central Maine, USA. *Forest Ecol Manag* 222, 234-253.
- Meesenburg, H., Eichhorn, J., Meiwes, K.J., 2009. Atmospheric deposition and canopy interactions. In: Brumme, R., Khanna, P.K. (Eds.), *Ecological Studies 208 - Functioning and Management of European Beech Ecosystems*, Berlin Heidelberg.
- Midwood, A.J., Proe, M.F., Harthill, J.J., 2000. Use and analysis by thermal ionisation mass spectrometry of Mg-26 and K-41 to assess mineral uptake in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Analyst* 125, 487-492.
- Moukoui, J., 2006. Effet des essences forestières sur la biodégradation des matières organiques : impacts sur la dynamique et le cycle du carbone, de l'azote et des éléments minéraux. Université Henri Poincaré, Nancy, 255
- Proe, M.F., Midwood, A.J., Craig, J., 2000. Use of stable isotopes to quantify nitrogen, potassium and magnesium dynamics in young Scots pine (*Pinus sylvestris*). *New Phytol* 146, 461-469.
- Puech, J., 2009. Mise en valeur de la forêt française et développement de la filière bois. Paris, 75
- Ranger, J., Andreux, F., Bienaimé, S., Berthelin, J., Bonnaud, P., Boudot, J.P., Bréchet C, Buée, M., Calmet, J., Chaussod, R., Gelhaye, D., Gelhaye, L., Gérard, F., Jaffrain, J., Lejon, D., Le Tacon, F., Lévêque, J., Maurice, J., Merlet, D., Moukoui, J., Munier-Lamy, C., Nourrisson, G., Pollier, B., Ranjard, L., Simonsson, M., Turpault, M.P., Vairelles, D., Zeller, B., 2004. Effet des substitutions d'essence sur le fonctionnement organo-minéral de l'écosystème forestier, sur les communautés microbiennes et sur la diversité des communautés fongiques mycorrhiziennes et saprophytes (cas du dispositif de Breuil - Morvan), Rapport final contrat INRA-GIP Ecofor 2001-24, No. INRA 1502A. INRA Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (UR 1138), 54280 Champenoux,
- Ranger, J., Bonnaud, P., Bouriaud, O., Gelhaye, D., Picard, J.F., 2008. Effects of the clear-cutting of a douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) plantation on chemical soil fertility. *Ann For Sci* 65, 303-316.
- Ranger, J., Turpault, M.-P., 1999. Input-output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *Forest Ecol Manag* 122, 139-154.
- Robbins, C.W., Carter, D.L., 1983. Selectivity coefficients for calcium-magnesium-sodium-potassium exchange in 8 soils. *Irrigation Science* 4, 95-102.
- Saggar, S., Bettany, J.R., Stewart, J.W.B., 1981. Measurement of microbial sulfur in soil. *Soil Biol. Biochem.* 13, 493-498.
- Sparling, G.P., West, A.W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C - Calibration insitu using microbial respiration and ¹⁴C labeled cells. *Soil Biol. Biochem.* 20, 337-343.
- Staaf, H., Berg, B., 1982. Accumulation and release of plant nutrients in decomposing Scots pine needle litter - Long-term decomposition in a Scots pine forest. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 60, 1561-1568.
- Stroud, J.L., Khan, M.A., Norton, G.J., Islam, M.R., Dasgupta, T., Zhu, Y.-G., Price, A.H., Meharg, A.A., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., 2011. Assessing the Labile Arsenic Pool in Contaminated Paddy Soils by Isotopic Dilution Techniques and Simple Extractions. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4262-4269.
- Sverdrup, H., Thelin, G., Robles, M., Stjernquist, I., Sörensen, J., 2006. Assessing nutrient sustainability of forest production for different tree species considering Ca, Mg, K, N and P at Björnstorps Estate, Sweden *Biogeochemistry* 81, 219-238.
- Sverdrup, H., Warfvinge, 1988. Weathering of primary silicate minerals in the natural soil environment in relation to a chemical weathering model. *Water Air Soil Poll* 38, 387-408.
- Tait, K., Sayer, J.A., Gharieb, M.M., Gadd, G.M., 1999. Fungal production of calcium oxalate in leaf litter microcosms. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1189-1192.
- Tate, K.R., Ross, D.J., Feltham, C.W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C - Effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.* 20, 329-335.
- Ulrich, B., 1983. Interaction of forest canopies with atmospheric constituents: SO₂, alkali and earth alkali cations and chloride. In: Ulrich, B., Pankrath, J. (Eds.), *Effects of accumulation of air pollutants in forest ecosystems*. D Reidel, Boston, pp. 33-45.
- van der Heijden, G., Legout, A., Midwood, A.J., Craig, C.A., Pollier, B., Ranger, J., Dambrine, E., accepted Plant and Soil. Mg and Ca root uptake and vertical transfer in soils assessed by an in situ ecosystemscale multi-isotopic (²⁶Mg & ⁴⁴Ca) tracing experiment in a beech stand (Breuil-Chenué, France). *Plant Soil*.

- van der Heijden, G., Legout, A., Nicolas, M., Ulrich, E., Johnson, D.W., Dambrine, E., 2011. Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change. *Forest Ecol Manag* 261, 730-740.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Bréchet, C., Ranger, J., Dambrine, E., accepted Geoderma. Tracing and modeling preferential water flow through a forest soil – potential impact on nutrient leaching. *Geoderma*.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Turpault, M.P., Ranger, J., Dambrine, E., accepted FEM. Sustainability of broadleaved forest nutrition facing reduced atmospheric deposition - A case study in the Morvan Mountains. *Forest Ecol Manag*.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707.
- Vanwesemael, B., 1993. Litter decomposition and nutrient distribution in humus profiles in some mediterranean forests in southern Tuscany. *Forest Ecol Manag* 57, 99-114.
- von Hevesy, G., Hofer, E., 1934. Die verweilzeit des wassers im menschlichen körper, untersucht mit hilfe von "schwerem" wasser als indicator. *Klinische Wochenschrift* 13, 1524.
- Vuorenmaa, J., 2004. Long-term changes of acidifying deposition in Finland (1973-2000). *Environ Pollut* 128, 351-362.
- Weatherall, A., Proe, M.F., Craig, J., Cameron, A.D., Midwood, A.J., 2006. Internal cycling of nitrogen, potassium and magnesium in young Sitka spruce. *Tree Physiol* 26, 673-680.
- Willison, T.W., Baker, J.C., Murphy, D.V., Goulding, K.W.T., 1998. Comparison of a wet and dry ^{15}N isotopic dilution technique as a short-term nitrification assay. *Soil Biol Biochem* 30, 661-663.
- Yanai, R.D., Blum, J.D., Hamburg, S.P., Arthur, M.A., Nezat, C.A., Siccama, T.G., 2005. New insights into calcium depletion in northeastern forests. *J. For.* 103, 14-20.



IX

Chapitre IX – Synthèse et Conclusions Générales

Les différents résultats de ce travail sont synthétisés dans ce chapitre. Dans une première partie, les connaissances acquises par les approches « classiques » de bilan de flux « entrées-sorties » et de ré-échantillonnage des stocks sont rappelées puis le dynamique des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca dans la litière, le sol et l'arbre est présentée dans une seconde partie. L'évolution du stock de Ca et Mg du sol estimée par les approches classiques et calculée en fonction de la dilution isotopique des traceurs est ensuite comparée et discutée. Enfin des perspectives, basées sur des expériences en cours, sont présentées, pour alimenter une discussion plus large sur l'utilisation des traçages isotopiques dans le milieu naturel.

I. Apports des approches conventionnelles à l'étude des flux d'éléments minéraux

L'objectif principal de cette thèse était d'améliorer la quantification *in situ* des flux et pools de calcium et magnésium dans un écosystème forestier où ces éléments sont très peu abondants. Les pools et les flux d'éléments minéraux dans la placette de hêtre du site expérimentale de Breuil-Chenu (58) ont tout d'abord été étudiés par des approches « conventionnelles » (mesure et comparaison des pools de nutriments, mesures ou estimations des flux, calcul des bilans de flux « entrées-sorties »). Cette première partie a permis d'établir un schéma de circulation de ces éléments dans cet écosystème qui est par la suite comparé aux résultats de l'expérience de traçage isotopique.

I.1. Evolution des réserves en Mg et Ca du sol entre 1974 et 2008

I.1.1. Synthèse des évolutions

I.1.1.1. Evolution des réserves de Mg et Ca du sol entre 1974 et 2001

Les réserves échangeables en magnésium et en calcium du sol ont été mesurées en 1974 avant plantation et en 2001. Bien que les méthodes d'échantillonnage et d'extractions entre les deux dates diffèrent, cette comparaison a permis de mettre en évidence les grandes tendances d'évolutions. Les réserves en magnésium échangeable ont dramatiquement diminuées entre 1974 et 2001 ($\sim 5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). Cette diminution s'est répartie sur l'ensemble du profil de sol. Cette diminution des réserves en Mg est en partie expliquée par l'immobilisation de magnésium dans la biomasse aérienne et dans l'humus ($\sim 1.3 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). Les pertes de magnésium restant inexplicables ($\sim 3.7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) sont probablement due à des pertes par drainage liées à :

- (3) Un flux de drainage de sulfate plus élevé sur la période 1974-2001 lié à des dépôts atmosphériques de soufre plus élevés.
- (4) La coupe à blanc du peuplement en 1975 qui a pu entraîner une minéralisation accrue de la matière organique, une production importante de nitrate (sans consommation) et un drainage de magnésium avec le nitrate comme anion vecteur.

En moyenne entre 1974 et 2001, les réserves de Ca ont diminué de $\sim 1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$. Cependant, cette diminution n'était pas significative puisqu'inférieure à la variabilité spatiale des réserves aux deux dates. La stabilité des réserves échangeables de Ca, par rapport aux pertes en magnésium au cours de la période 1974-2001 est surprenante. Il est possible que des dépôts atmosphériques de Ca plus élevés ($> 8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ en moyenne entre 1974 et 2001) aient pu compenser au moins partiellement l'important flux d'immobilisation de Ca dans la biomasse aérienne ($\sim 5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) et dans l'humus qui s'est épaissi au cours du temps ($\sim 1.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). De tels dépôts sont plausibles.

I.1.1.2. Bilans de flux « entrées-sorties » sur la période 2003-2008

Les bilans de flux « entrées-sorties » calculés sur la période 2003-2008 (Table IX-1) ont permis de mettre en évidence une perte nette de soufre ($4.9 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) résultant de la désorption de sulfate accumulés préalablement à la diminution des dépôts atmosphériques de soufre depuis les années 1990. Ce flux de désorption de sulfate maintient un flux de drainage élevé en calcium et en magnésium. En conséquence, sur la période 2003-2008, les pertes par drainage sont de $1.4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ de calcium et $0.9 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$ de magnésium. Pour le calcium et le magnésium, les entrées sont inférieures aux sorties du système, conduisant à des bilans négatifs pour le calcium ($-3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) et magnésium ($-0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$).

La précision des bilans de flux « entrées-sorties » dépend de l'incertitude autour de chacun ces flux dont l'estimation est complexe. La validation des bilans de flux « entrées-sorties » par une mesure de l'évolution des réserves en nutriments du sol entre deux dates requiert que les changements soient suffisamment grands au regard de la variabilité spatiale toujours forte en sol forestier.

		Ca	Mg	K	N	P	S
Inputs	wet deposition	2.2	0.5	0.9	7.9	-	3.2
	dry deposition	1.5	0.3	0.7	4.4	-	1.3
	Atmospheric deposition	3.7	0.8	1.6	12.3	-	4.5
	Weathering	0.2	0.5	2.9	-	-	-
Cycling	Throughfall	2.5	0.6	11.2	6.3	-	3.4
	Stemflow	0.5	0.2	4.3	2.2	-	1.1
	Foliar absorption	0.8	0.0	0.0	3.8	-	0.0
	Foliar leaching	0.1	0.1	13.9	0.0	-	0.0
	Litterfall	10.4	1.6	8.9	44.6	1.9	-
Outputs	Leaching 15cm	2.0	1.2	1.5	4.0	0.1	6.1
	Leaching 30cm	1.2	1.1	1.4	2.2	0.1	9.5
	Leaching 60cm	1.4	0.9	2.6	2.3	0.1	9.4
	Net uptake	5.6	1.2	8.9	14.3	1.5	-
Budget	-3.1	-0.8	-7.1	-4.2	-1.6	-4.9	

Table IX-1 : Résumé des différents flux de calcium, magnésium, potassium, azote, phosphore et soufre dans l'écosystème en $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$.

I.1.2. Causes potentielles des pertes de Ca et Mg depuis la coupe-à-blanc du peuplement précédent

Comme discuté précédemment, il est probable que les dépôts de sulfates aient fortement impacté les réserves échangeables de Mg et de Ca des sols de cet écosystème. La diminution des dépôts atmosphériques de calcium depuis les années 1970 pourrait en partie expliquer les pertes en calcium suggérées par les bilans de flux « entrées-sorties ». Cependant, la sylviculture (coupe à blanc et andainage) semble être le facteur prépondérant pour expliquer l'évolution des réserves de Mg et de Ca du sol depuis 1974.

- i. La mise en lumière liée à la coupe à blanc en 1975 a pu entraîner la minéralisation de la matière organique et une forte perte par drainage de Mg. Le Mg a pu être préférentiellement lixivié par rapport au calcium pour deux raisons :
 - a. Le calcium aurait été plus fortement retenu dans le profil de sol par sa plus grande affinité pour la capacité d'échange cationique de la matière organique (Sentenac and Grignon, 1981) qui semble participer à une grande part de la CEC totale dans la placette de hêtre (§ II.3.1). Cette hypothèse est particulièrement illustrée par les résultats du traçage isotopique
 - b. Après une perturbation de l'écosystème (tempête, coupe...), la composition des eaux de drainage est similaire à la composition de la CEC du sol (Legout *et al.*, 2009) et le magnésium représentait 53% des cations nutritifs (Mg+Ca+K) sur la CEC en 1975.
- ii. Une grande partie des pertes observées de Mg entre 1974 et 2001 aurait pu être compensée par les réserves de Mg contenues dans les rémanents d'exploitation et la litière au sol avant andainage en 1975 si ces deux compartiments n'avaient pas été sortis de la placette.

Les réseaux de placettes permanentes tels que le réseau RENECOFOR et le réseau européen ICP-Forests ont été mis en place pour étudier l'impact des dépôts atmosphériques acides sur les écosystèmes forestiers et sont d'excellents outils pour étudier les cycles biogéochimiques. Cependant, le facteur principal dans l'évolution de la fertilité chimique des sols forestiers est vraisemblablement actuellement la sylviculture, en particulier dans cet écosystème à faible fertilité minérale.

Les politiques forestières préconisent une exploitation accrue dans bon nombre d'écosystèmes forestiers (Ericsson, 2004; Puech, 2009). Les réseaux de placettes permanentes ne sont pas adaptés pour étudier l'effet d'une sylviculture plus intensive (rotations plus courtes, exportation accrue de biomasse notamment de rémanents d'exploitation) sur l'évolution à long-terme des cycles biogéochimiques.

I.2. Cycles biogéochimiques du magnésium et du calcium illustrés à partir de l'approche classique de la mesure des réserves et flux

I.3.1. Importance des différents flux dans les cycles du magnésium et du calcium

Les différences de flux (entrées, sorties et internes à l'écosystème, Table IX-1) observées entre le magnésium et le calcium mettent en évidence des différences entre ces deux éléments. Le flux d'altération minéral est proportionnellement plus important pour le magnésium que pour le calcium. Les minéraux primaires porteurs de calcium sont quasiment absents alors que le magnésium peut être trouvé dans les minéraux primaires et secondaires tels que la biotite (Mareschal, 2008). Le calcium est proportionnellement plus abondant que le magnésium dans la biomasse aérienne et la litière au sol. La nutrition en calcium des plantes reposerait en grande partie sur le maintien de cet élément par recyclage biologique, et sur les dépôts atmosphériques,

nettement supérieurs au flux d'altération (voir partie I.3.2). Ceci est illustré par l'importance relative de chacun des flux « entrée » et « sortie » du bilan de flux « entrées-sorties » (Table IX-2). Alors que le flux de libération de magnésium par altération minérale est équivalent aux autres flux, le flux de libération de calcium par altération minérale ne représente que 2 % de la somme de tous les flux entrants et sortants.

	Dépôts atmosphériques	Altération minérale	Immobilisation	Drainage
Mg	23%	16%	34%	27%
Ca	34%	2%	51%	13%

Table IX-2 : Importance relative de chaque flux entrée et sorties du bilan de flux « entrées-sorties ». Chaque flux est exprimé en pourcentage de la somme de tous les flux : AD (Dépôts atmosphériques), W (altération minérale), U (immobilisation dans la biomasse aérienne ligneuse) et L (pertes par drainage).

I.3.2. Importance du recyclage interne

Dans cet écosystème forestier, les pools de magnésium et de calcium disponibles sont très faibles. Le recyclage des nutriments par le cycle biologique est probablement le principal facteur garantissant la nutrition des arbres. Les pools de magnésium et de calcium dans la litière au sol et la biomasse aérienne sont plus importants que le pool échangeable du sol (0-70 cm) sur la période d'étude. Le prélèvement et le retour au sol (chute de litière) de magnésium et de calcium sont les flux les plus importants dans le renouvellement (entrées et sorties) des pools échangeables du sol (Figure IX-1). La chute annuelle de litière permet par exemple à elle seule de renouveler 4.9% et 17.2% des stocks échangeables du sol, pour Mg et Ca respectivement. Enfin, les concentrations de magnésium et calcium échangeables étaient plus élevées dans les horizons superficiels du sol (0-5 cm).

La définition de la fertilité minérale d'un écosystème ne peut donc se limiter à la taille des pools de nutriments disponibles à la nutrition des plantes mais résulte de la conjugaison de la taille des pools disponibles et du volant d'éléments minéraux circulant dans l'écosystème par l'intermédiaire du cycle biologique.

I.3.3. Autres sources potentielles de magnésium et de calcium dans l'écosystème

Comme discuté précédemment, les pools de magnésium et de calcium stockés dans la biomasse aérienne et dans la litière au sol représentent d'importants réservoirs. Cependant, dans les concepts actuels des cycles biogéochimiques, ces réservoirs ne sont pas directement disponibles à la nutrition des plantes et à la croissance de nouveaux organes végétaux. Les variations temporelles de ces réservoirs ne sont que très rarement quantifiées mais pourrait fournir à court ou moyen-terme une source non-négligeable de magnésium et de calcium. La Figure IX-2 illustre les quantités de magnésium et calcium disponibles dans le concept actuel des bilans de flux « entrées-sorties » (échangeables dans le sol) et potentiellement disponibles (humus, minéralomasse) dans l'écosystème au regard des besoins annuels des arbres (immobilisation).

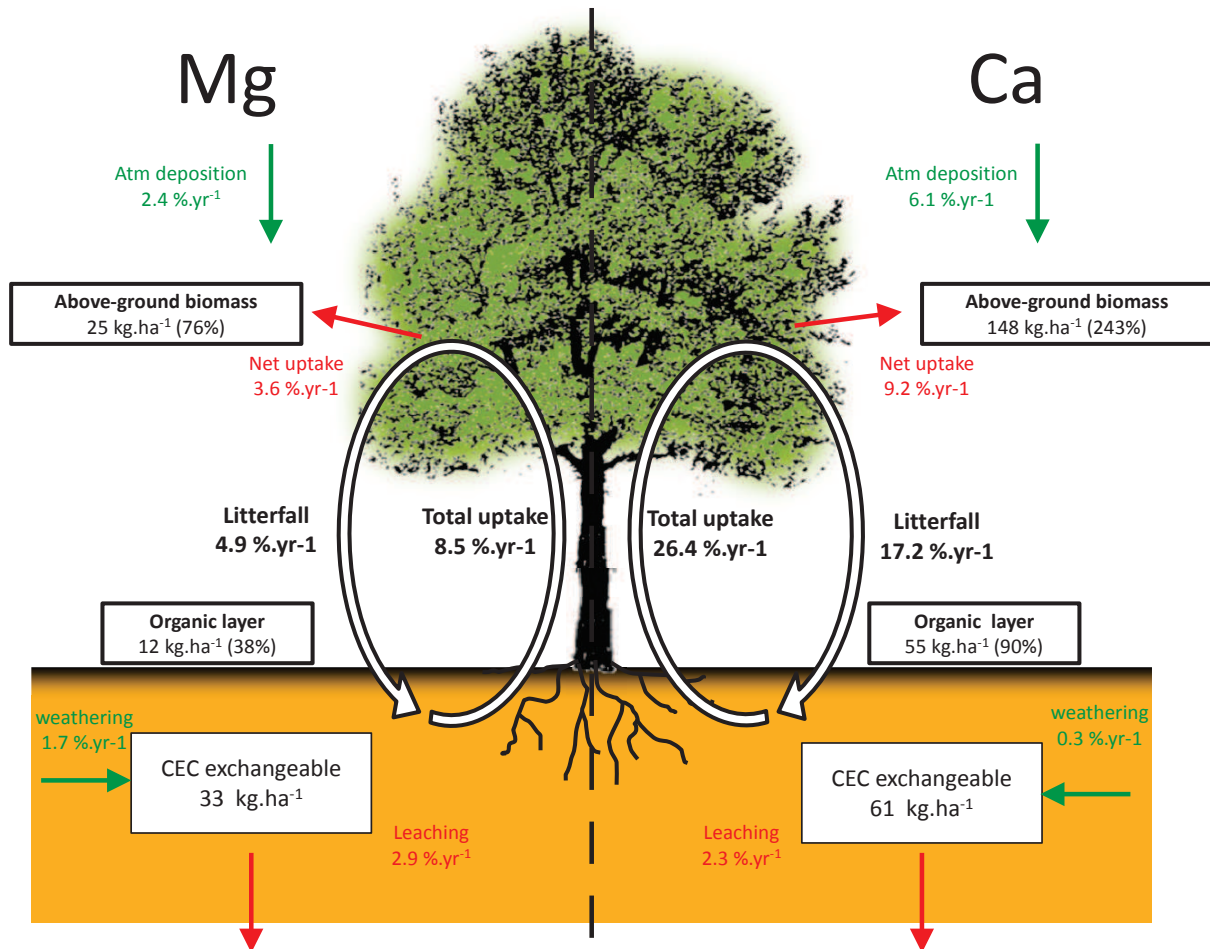


Figure IX-1 : Taux de renouvellement théorique des stocks de magnésium et de calcium échangeables du sol de chaque flux. La taille relative de chaque flux est exprimée en fonction du pool échangeable du sol (Flux/ pool échangeable du sol). Les pools de nutriments dans la biomasse aérienne et dans la litière au sol sont exprimés en kg.ha⁻¹ et en taille relative (pool / pool échangeable du sol).

Dans une étude récente utilisant les variations isotopiques naturelles du calcium, Farkaš *et al.* (2011) ont souligné l'importance de l'humus comme source principale de nutriments pour les arbres. En Suède, les stocks échangeables dans l'humus sont systématiquement mesurés (Olsson *et al.*, 1996; Hansson *et al.*, 2011). Cependant, comme pour les stocks échangeables du sol, quantifier les variations temporelles des stocks de nutriments dans la litière au sol est rendue difficile à cause de la très forte variabilité spatiale de ces stocks (Bens *et al.*, 2006; Legout *et al.*, 2008).

La mobilité du magnésium dans les plantes a déjà été démontrée. Avant la chute des feuilles, le magnésium est mobilisé des feuilles vers des organes de stockage (Oren *et al.*, 1988; Bolou-Bi *et al.*, 2012). Avec une expérience de traçage isotopique *ex situ* dans des jeunes plants de pin sylvestre, Proe *et al.* (2000) ont montré que le recyclage interne à la plante contribuait à hauteur de 50 % dans la croissance de nouveaux organes. Avec une expérience similaire avec

des jeunes plants d'épicéa de Sitka, Weatherall *et al.* (2006b) ont montré que 30% à 50% du magnésium des nouveaux organes provenait du recyclage interne. Les études de recyclage interne du calcium sont plus rares. Cependant, Nakata (2003) a montré que le calcium stocké dans les tissus sous forme d'oxalate de calcium pouvait être remobilisé pour faire face à une carence nutritive en cet élément.

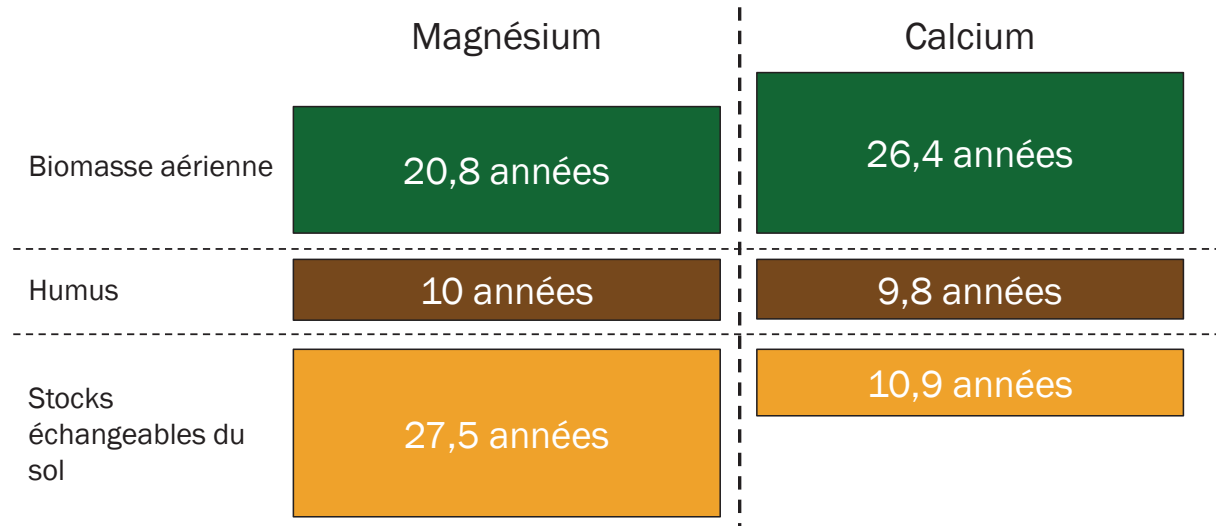


Figure IX-2 : Importance potentielle des différents stocks de magnésium et de calcium dans l'écosystème représentée en nombre d'années d'immobilisation annuel dans la biomasse (stocks en $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ /immobilisation annuel $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$)

I.3.4. Autres sources potentielles de magnésium et de calcium « extérieures » à l'écosystème

Des sources externes à l'écosystème qui ne sont pas prises en compte dans les approches conventionnelles pourraient jouer un rôle dans la nutrition en magnésium et en calcium des arbres :

- i. Il est difficile de statuer sur la profondeur au-delà de laquelle le flux de drainage des éléments minéraux est une perte de nutriments pour l'écosystème.
- ii. Les dépôts atmosphériques particuliers ne sont pas « classiquement » pris en compte. Cependant, Lequy *et al.* (2012) ont montré que les apports atmosphériques sous forme particulière pouvaient représenter jusqu'à 30% des entrées.
- iii. Les nutriments dans les dépôts atmosphériques dissous (humides et secs) peuvent être absorbés directement au niveau des feuilles (Bukovac and Wittwer, 1957; Chishaki *et al.*, 2007).

II. Incorporation des traceurs (^{26}Mg et ^{44}Ca) dans les cycles biogéochimiques du Mg et du Ca

Au travers des résultats acquis par les approches conventionnelles précédemment détaillées, nous aurions pu conclure à une circulation rapide du Mg et du Ca dans l'écosystème

pour compenser les très faibles réserves de ces éléments minéraux dans le sol de la placette. Cependant, l'incorporation des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca aux cycles biogéochimiques a été très lente. Cependant même si l'incorporation du Mg et du Ca aux cycles est lente, le système est très conservatif et aucune perte de ^{26}Mg et ^{44}Ca par drainage n'a été observée durant les deux ans de suivi de la placette après l'expérience de traçage. Les processus en jeu pour expliquer ces faibles vitesses mais la forte conservation sont nombreux.

II.1. Rétention dans la couche de litière au sol

La capacité d'échange cationique de la matière organique et la forte affinité des cations (le calcium en particulier) pour la matière organique sont des processus qui ont été étudiés par de nombreux auteurs. Par exemple, les stocks de cations échangeables dans l'humus est une analyse conventionnelle en Suède où la dégradation lente de la matière organique au sol génère des humus à couche OH épaisse (Olsson *et al.*, 1996; Hansson *et al.*, 2011). La rétention des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca bien qu'attendue, s'est avérée très élevée sur la placette de traçage. En effet, la couche de litière au sol était peu épaisse (1-2cm) et majoritairement composée de feuilles de l'année peu fragmentées (OL). Cependant, $\sim 100\%$ du ^{44}Ca et $\sim 80\%$ du ^{26}Mg ont été trouvés dans la couche de litière au sol au lendemain de l'apport des traceurs au sol alors que (i) la solution de traçage avait une forte concentration en NO_3 de l'ordre de 400ppm de N ($1 \text{ kgN}\cdot\text{ha}^{-1}$) et (ii) qu'une lame d'eau de 16 mm d'eau déminéralisée a été apportée juste après pulvérisation de la solution de traçage à la surface du sol.

Le magnésium semble ensuite avoir été moins bien retenu que le calcium dans l'humus. 20% du ^{26}Mg apporté ont en effet été perdus le jour suivant l'apport des traceurs. Nous n'avons pas mesuré l'enrichissement dans le sol cette même journée mais nous pouvons supposer qu'une bonne partie de ces 20% a été transféré dans le premier horizon de sol (0-2.5cm). Une grande part du ^{26}Mg retenue dans la litière au sol a ensuite été rapidement libérée : une semaine après l'apport des traceurs, la litière au sol ne contenait plus que 40% du ^{26}Mg apporté. La libération du Ca était beaucoup plus lente : 68% du ^{44}Ca était encore retenu après un an (avril 2011) et 33% après deux ans (mars 2012). En mars 2012, seul 8% du ^{26}Mg apporté a été retrouvé dans la litière au sol.

La libération rapide de ^{26}Mg durant la première semaine après l'apport de la solution de traçage est probablement liée à la rétention de magnésium dans la couche de litière sous forme dissoute (stockage dans l'eau retenue dans la litière) alors que le calcium, ayant une plus forte affinité pour la capacité d'échange cationique organique, a été plus fortement retenu. Une part non négligeable du $^{15}\text{NO}_3$ appliqué ($\sim 20\%$) a été retenu dans la litière au sol durant la première semaine après l'apport de la solution de traçage. La mobilisation de ces nitrates par diffusion ou par flux de masse (flux d'eau) a probablement mobilisé le ^{26}Mg .

La rétention et la libération de Mg et de Ca dans litière au sol est donc un facteur important expliquant les faibles vitesses d'incorporation de ces éléments aux cycles biogéochimiques. Cette rétention contribuerait également à la conservation des intrants de Mg et Ca par les apports atmosphériques. Le Mg et le Ca ont révélés des comportements différents dans la litière au sol. Ces différences s'expliquent probablement par la plus grande affinité du Ca pour la capacité d'échange cationique de la matière organique comparé à Mg (Salmon, 1964; André and Pijarowski, 1977; Baes and Bloom, 1988; Ponette *et al.*, 1997; Curtin *et al.*, 1998;

DeSutter *et al.*, 2006). En effet, alors que le Ca forme des complexes avec certains groupes fonctionnels des molécules organiques, le Mg est lié à la matière organique par des liaisons électrostatiques (Sentenac and Grignon, 1981). Cette différence d'affinité explique probablement aussi les différentes dynamiques de libération du Mg et Ca de la litière au cours des deux années de suivi. Le Mg aurait été, en plus grande partie, libéré par des processus d'échanges d'ion avec les eaux de pluie et pluviocessivats tandis que le Ca aurait été majoritairement libéré par minéralisation de la matière organique : décomposition de sites d'échanges d'ion ou incorporation du Ca au sol par lessivage ou bioturbation (transfert particulaire de Ca lié à la matière organique).

II.2. Immobilisation de magnésium dans la biomasse microbienne du sol

Le rôle des communautés microbiennes (communautés bactérienne et fongiques) dans l'immobilisation de nutriments dans le sol a été mis en évidence pour le carbone (Vance *et al.*, 1987; Sparling and West, 1988; Tate *et al.*, 1988), l'azote (Brookes *et al.*, 1985), phosphore (Brookes *et al.*, 1982) et le soufre (Saggar *et al.*, 1981; Castellano and Dick, 1991). L'immobilisation de cations alcalins et alcalino-terreux dans la biomasse microbienne n'a été que très peu quantifiée : la seule étude existante à notre connaissance est celle de Lorenz *et al.* (2010) qui a montré une importante immobilisation du potassium.

En appliquant le protocole d'extraction de sol après fumigation de celui au chloroforme, nous avons mis en évidence sur la période d'étude une immobilisation microbienne de magnésium dans les 30 premiers centimètres de sol et de potassium dans les 15 premiers centimètres du sol. Les concentrations en Mg et K des extractions après fumigation au chloroforme étaient respectivement en moyenne 2.2 et 1.4 fois plus élevées que les extractions sans fumigation préalable. Le Mg et K immobilisés dans la biomasse microbienne du sol peut donc représenter un stock non négligeable dans les écosystèmes à faible fertilité minérale. Il serait intéressant de quantifier l'immobilisation microbienne de Mg et de K sur une large gamme de sol et de comparer les stocks échangeable et microbien obtenus avec les stocks échangeables mesurés « classiquement » (séchage du sol avant extraction). Ceci permettrait de connaître l'importance du rôle de l'immobilisation microbienne dans les cycles de Mg et K et aussi de vérifier si les pools de Mg et K disponibles mesurés par extraction « classique » sont sous-estimés par les méthodes conventionnelles. Aucune immobilisation microbienne de calcium n'a pu être mise en évidence. Cependant, l'immobilisation de calcium dans les micro-organismes tels que les champignons pourrait être sous forme de cristaux d'oxalate de calcium (Malajczuk and Cromack, 1982). Dans quel cas, le protocole d'extraction de sol à l'acétate d'ammonium serait inadapté pour extraire le calcium de ces cristaux.

Le suivi de l'enrichissement isotopique ($\delta^{26}\text{Mg}$) des pools échangeable et immobilisé dans la biomasse microbienne (Figure IX-3) a permis de mettre en évidence les différentes sources de nutriments immobilisés par les micro-organismes.

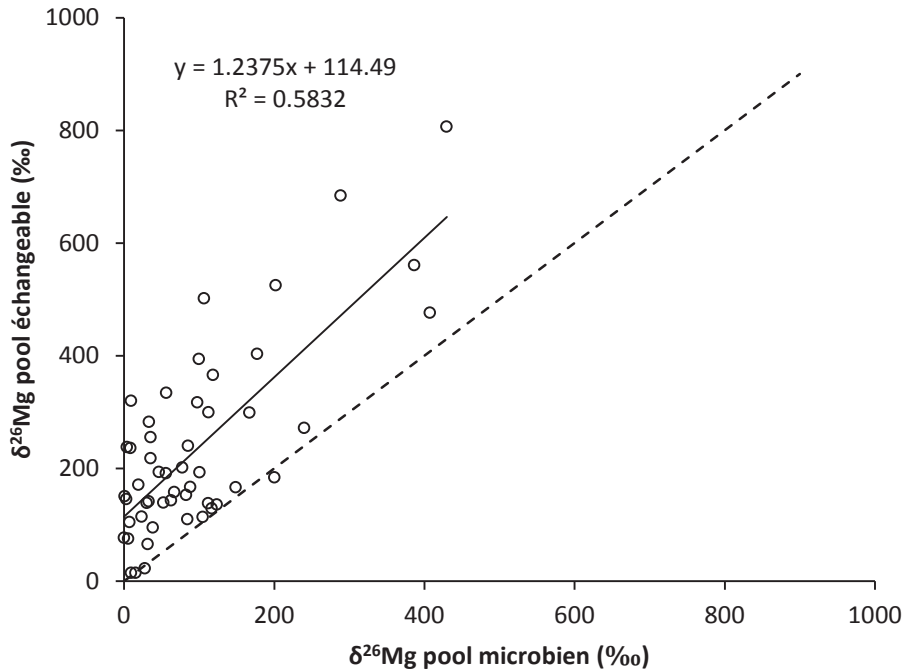


Figure IX-3 : Comparaison de l'enrichissement isotopique $\delta^{26}\text{Mg}$ des pools microbien et échangeable du sol (0-30cm) sur l'ensemble de la période d'étude (avril 2010-mars 2012). La première bissectrice est représentée par la droite en pointillés.

L'enrichissement isotopique ($\delta^{26}\text{Mg}$) du pool microbien était fortement corrélé au $\delta^{26}\text{Mg}$ du pool échangeable ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.58$). Le pool échangeable de Mg était donc une source très importante pour les micro-organismes. Cependant, le $\delta^{26}\text{Mg}$ du pool microbien était systématiquement inférieur au $\delta^{26}\text{Mg}$ du pool échangeable indiquant une autre ou plusieurs autres sources de Mg (signature isotopique plus proche de l'abondance naturelle) immobilisées par les micro-organismes. Ces sources pourraient être :

- i. L'altération minérale. En effet, il a été montré que les micro-organismes ont la capacité d'altérer les minéraux du sol (Jongmans *et al.*, 1997; Calvaruso *et al.*, 2006; Arocena *et al.*, 2011) ;
- ii. Du magnésium lié à la matière organique. Les micro-organismes jouent un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique du sol. Le magnésium contenu dans la structure des tissus végétaux en décomposition (feuilles, branches) a une signature isotopique proche de l'abondance naturelle ;
- iii. Il est possible que les hyphes mycéliens prospectent un très grand volume de sol et prélèvent des cations nutritifs en profondeur (gradient d'enrichissement isotopique de la surface vers les horizons profonds).

II.3. Transfert vertical dans le profil de sol

II.3.1. Différents types de transfert dans le sol

Les vitesses de transfert dans le sol sont plus élevées pour le Mg que pour le Ca. En effet, au bout de deux ans 15% du ^{26}Mg a été trouvé en dessous de 15cm de profondeur alors que seul

9% du ^{44}Ca a été trouvé en dessous de 5cm de profondeur. De même, les solutions de sol à 30 cm ont révélé la présence de ^{26}Mg à cette profondeur mais pas de ^{44}Ca . La différence de transfert dans le sol s'explique en grande partie par la forte contribution de la matière organique à la CEC totale du sol. En effet, il a été estimé que la matière organique contribuerait à hauteur de 75% de la CEC totale à la surface du sol et de 40% en profondeur (25-40 cm). Comme discuté précédemment, l'affinité du Ca pour la capacité d'échange cationique de la matière organique est plus élevée que celle du Mg. Le Ca aurait donc été plus fortement retenu que le Mg au cours de son transfert à travers le profil de sol. Les différences de vitesses de migration du magnésium et du calcium à travers le profil de sol sont en accord avec l'hypothèse d'une perte de magnésium bien plus élevée que le calcium après la coupe à blanc en 1975

Le traçage isotopique de l'eau (^2H) a permis de mettre en évidence l'existence de flux préférentiels d'eau dans le profil de sol. Le suivi de la composition isotopique des solutions de sol a permis d'étudier le transfert vertical des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans le profil et de les comparer aux vitesses de transfert de l'eau évaluées grâce aux courbes d'élution du ^2H . Différents types de transfert de Mg et de Ca dans le profil de sol ont été mis en évidence (Figure IX-4). Les différents types de transfert observés semblent expliqués par (i) le type de flux d'eau (flux préférentiel ou matriciel) et par (ii) la contribution relative de la CEC organique et de la CEC minérale des horizons traversés. La variabilité spatiale élevée de ces différents types de transfert pourrait s'expliquer par la forte variabilité spatiale des propriétés physiques (porosité totale du sol, distribution des tailles de pores, granulométrie...) et chimiques (taux de matière organique, distribution des minéraux...). Une synthèse est proposée ci-dessous :

(3) Transfert rapide avec les flux préférentiels d'eau

- i. **'Mineral Pipe flow'** Transfert rapide de ^{26}Mg and ^{44}Ca à travers le sol avec les flux préférentiels d'eau avec une interaction avec la CEC du sol majoritairement d'origine minérale. Le transfert de magnésium et de calcium peut être retardé par rapport au transfert d'eau mais les vitesses de transfert de magnésium et de calcium sont similaires car les affinités du magnésium et du calcium pour la CEC minérale sont proches ($K_{\text{Ca-Mg}} \approx 1$). Vitesses de transfert :

$$H_2O \geq Mg \approx Ca$$

- ii. **'Organic Pipe flow'** Transfert rapide de ^{26}Mg and ^{44}Ca à travers le sol avec les flux préférentiels d'eau avec une interaction avec la CEC du sol majoritairement d'origine organique. Le transfert de magnésium et de calcium a ainsi pu être retardé par rapport au transfert d'eau et le transfert de calcium est retardé par rapport au magnésium à cause de la sélectivité de la CEC organique ($K_{\text{Ca-Mg}} \gg 1$). Vitesses de transfert :

$$H_2O \geq Mg > Ca$$

(4) Transfert lent avec le flux matriciel d'eau

- i. **'Mineral Matrix flow'** Transfert lent de ^{26}Mg and ^{44}Ca à travers le sol avec le flux matriciel d'eau avec une interaction avec la CEC du sol d'origine minérale. Le transfert de magnésium et de calcium est retardé par rapport au transfert d'eau mais les vitesses de transfert de magnésium et de calcium sont similaires car les affinités

du magnésium et du calcium pour la CEC minérale sont proches ($K_{Ca-Mg} \approx 1$). Vitesses de transfert :

$$H_2O \gg Mg \approx Ca$$

- ii. **'Organic Matrix flow'** Transfert lent de ^{26}Mg and ^{44}Ca à travers le sol avec le flux matriciel d'eau avec une interaction avec la CEC du sol majoritairement d'origine organique. Le transfert de magnésium et de calcium est retardé par rapport au transfert d'eau et le transfert de calcium est retardé par rapport au magnésium à cause de la sélectivité de la CEC organique ($K_{Ca-Mg} \gg 1$). Vitesses de transfert :

$$H_2O \gg Mg \gg Ca$$

Quelle que soit la vitesse de transfert de l'eau, les processus expliquant l'éluion des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca dans le profil semblent identiques. De façon surprenante, les transferts rapides semblent en effet également impactés par la présence d'une capacité d'échange, qu'elle soit organique ou minérale.

II.3.2. Pertes par drainage

Les flux préférentiels ont une influence sur les dynamiques des cations nutritifs dans le sol comme discuté précédemment. Cependant, quelle que soit la vitesse de transfert du Mg et de Ca dans le sol ceux-ci sont retenus dans le profil de sol sur la capacité d'échange cationique du sol. En effet, aucune perte par drainage n'a été observée au cours des deux ans de suivi de la placette après l'apport des traceurs :

- i. La composition isotopique des solutions de sol collectées à 60 cm n'a pas révélée la présence de ^{26}Mg ou ^{44}Ca à cette profondeur durant les deux ans de suivi;
- ii. Le suivi de la composition isotopique de la capacité d'échange cationique du sol à 60cm n'a pas révélé la présence de ^{44}Ca à cette profondeur durant les deux ans de suivi et n'a révélé qu'une très faible présence de ^{26}Mg (seulement à partir de mars 2012).
- iii. 100% du ^{26}Mg et ^{44}Ca appliqués a été retrouvé dans les différents compartiments de l'écosystème en mars 2012 (§ IV).

II.4. Prélèvement de Mg et Ca par les arbres

II.4.1. Sources de Mg et Ca pour le prélèvement racinaire

Le suivi de l'enrichissement isotopique des racines fines au cours du temps a permis de mettre en évidence l'absorption racinaire des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca . Même si l'enrichissement racinaire mesuré a progressivement augmenté au cours de la première année après l'apport des traceurs, il est probable que l'absorption racinaire soit un processus quasi-immédiat et que cette augmentation progressive de l'enrichissement soit simplement due au transfert progressif de ^{26}Mg et de ^{44}Ca dans le sol. En effet, l'enrichissement isotopique des racines fines est corrélé à l'enrichissement des pools échangeables de Mg et de Ca (Figure IX-5).

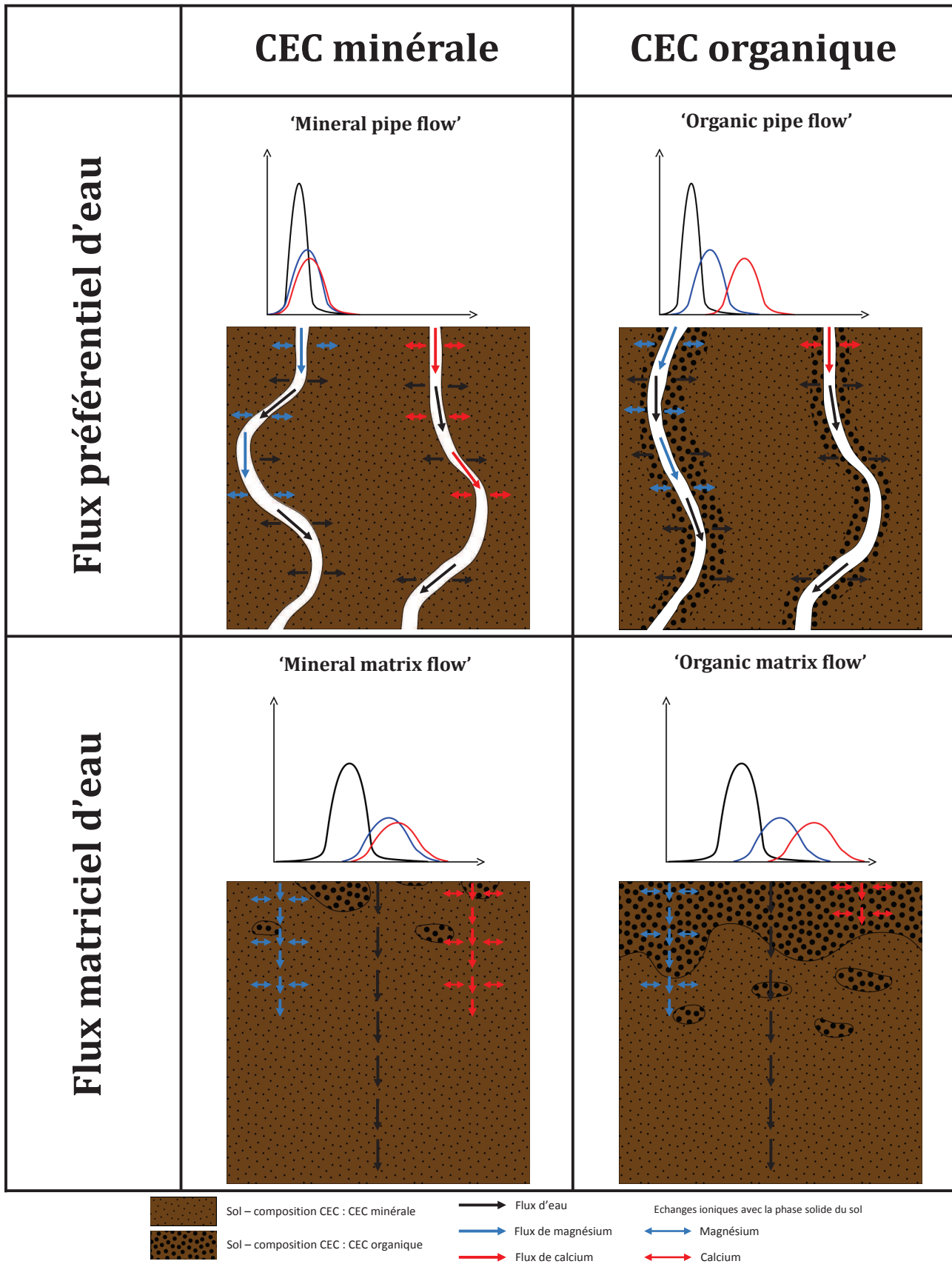


Figure IX-4: Synthèse des différents types de flux de magnésium et de calcium dans le profil de sol en fonction du type de flux d'eau (matriciel ou préférentiel) et de la composition de la CEC (organique ou minérale) du matériau traversé.

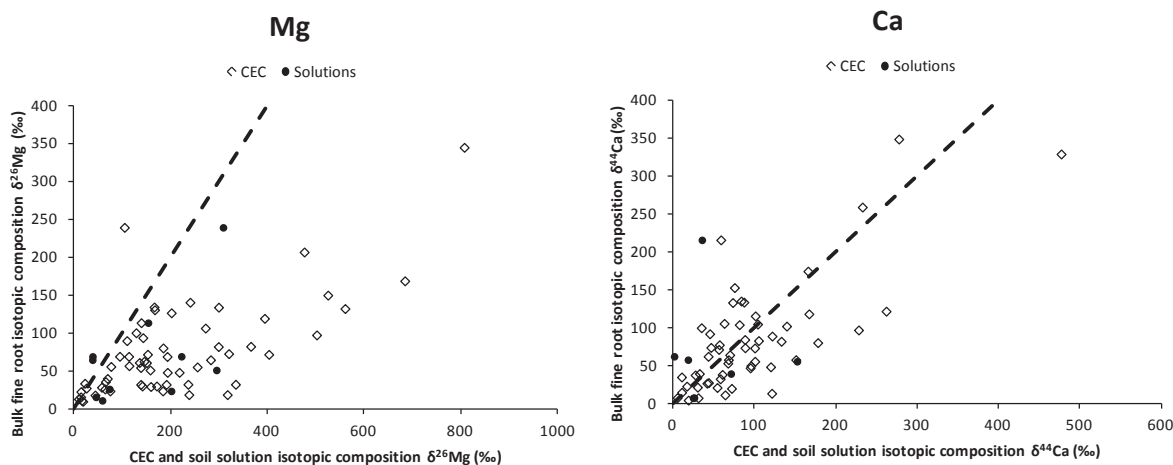


Figure IX-5 : Comparaison de l'enrichissement isotopique $\delta^{26}\text{Mg}$ des racines fines au $\delta^{26}\text{Mg}$ du pool échangeable du sol et des solutions de sol sur l'ensemble de la période d'étude (avril 2010-mars 2012). La première bissectrice est représentée par la droite en pointillés.

Cependant, bien que l'enrichissement isotopique ($\delta^{26}\text{Mg}$) des racines fines soit corrélé au $\delta^{26}\text{Mg}$ du pool échangeable, des enrichissements plus élevés ont été observés pour ce dernier. Cette différence peut être expliquée par :

- iii. une ou plusieurs sources de prélèvement racinaire autres que le pool échangeable (matière organique, altération minérale, biomasse microbienne du sol, prélèvement profond)
- iv. une dilution isotopique du Mg prélevé par un flux de Mg de composition isotopique proche de l'abondance naturelle via le phloème.

L'enrichissement isotopique ($\delta^{26}\text{Mg}$) des racines fines est relativement proche du $\delta^{26}\text{Mg}$ du pool microbien (Figure IX-6). Il est donc probable que ce pool microbien soit la source principale de Mg pour le prélèvement racinaire. Ceci s'explique en grande partie par le rôle de la mycorhization des racines pour le prélèvement de nutriments dans le sol. Il est probable que la différence de signature isotopique du pool microbien et des racines fines avec la signature isotopique du pool échangeable soit le résultat du prélèvement direct de magnésium issu du flux d'altération minérale. En effet, si la décomposition de la matière organique était à l'origine de cette différence de signature isotopique, les racines fines seraient aussi moins enrichies en ^{44}Ca puisque la décomposition de la matière organique libère à la fois du calcium et du magnésium, d'autant plus que la concentration du Ca dans la matière organique est plus élevée que le Mg. L'hypothèse de l'altération minérale est plausible car (1) de nombreuses études ont montré la libération de Mg par altération microbienne des minéraux porteurs de magnésium du sol (Calvaruso *et al.*, 2006; Arocena *et al.*, 2011) et (2) les minéraux du sol sont pauvres en calcium.

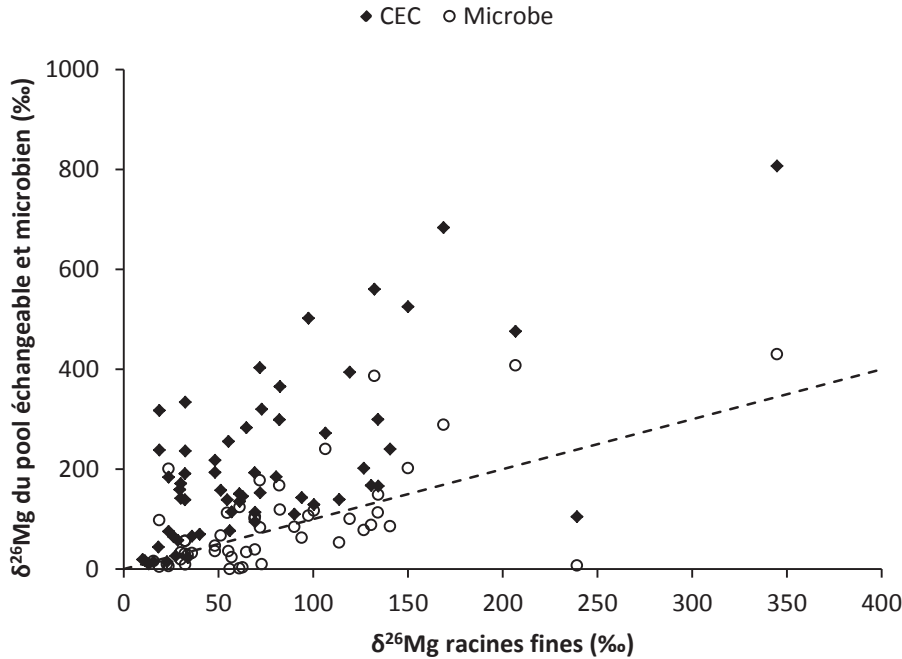


Figure IX-6 : Comparaison de l'enrichissement isotopique $\delta^{26}\text{Mg}$ des racines fines au $\delta^{26}\text{Mg}$ des pools microbien et échangeable du sol sur l'ensemble de la période d'étude (avril 2010-mars 2012). La première bissectrice est représentée par la droite en pointillés.

En posant l'hypothèse que le prélèvement de traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca est représentatif du prélèvement des apports atmosphériques de magnésium et de calcium, la contribution à la nutrition des arbres des apports atmosphériques sur 2 ans peut être estimée : 27.6% pour le magnésium et 20.4% pour le calcium. Au regard des faibles stocks échangeable et comme discuté précédemment (§ I.2.1), un prélèvement rapide des apports atmosphériques ainsi qu'une circulation rapide des nutriments dans l'écosystème étaient attendus. Cependant, les vitesses de transfert de magnésium et de calcium dans le profil de sol étant très faibles, il est fort probable que la majeure partie des 72.4% et 79.6% de magnésium et calcium restant soit prélevée dans les années suivantes. Ces résultats mettent également en évidence une circulation lente du calcium et magnésium et soulignent le caractère conservatif de ces cycles.

II.4.2. Prélèvement d'eau et de cations nutritifs

Il est généralement admis que le prélèvement de calcium et de magnésium résulte du flux de masse d'eau du sol jusqu'aux racines (Oliver and Barber, 1966; Barber, 1995). Cependant, le prélèvement de traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca n'a pas pu être prédit avec un modèle basé sur la composition chimique et isotopique des solutions de sol et le flux de transpiration. En effet, quelle que soit la profondeur (0 cm, 10cm, 15 cm, 30cm ou 60cm) et quel que soit le type de solution de sol prélevée (plaque lysimétrique ou bougie poreuse), le modèle n'est pas capable de prédire 100% du prélèvement de ^{26}Mg et ^{44}Ca mesuré (Table IX-3).

Collector	Depth	²⁶ Mg		⁴⁴ Ca	
		Mean	SD	Mean	SD
ZTL	0 cm	53%	16%	78%	11%
ZTL	10 cm	23%	1%	49%	7%
TCL	15 cm	4%	2%	6%	1%
TCL	30 cm	1%	1%	5%	1%
TCL	60 cm	0%	0%	6%	0%

Table IX-3 : Contribution maximale des différentes solutions du sol échantillonnées au flux de prélèvement de ²⁶Mg et de ⁴⁴Ca exprimé en pourcentage du prélèvement de ²⁶Mg et ⁴⁴Ca mesuré.

Au cours des saisons de végétation en 2010 et 2011, la réserve en eau utile du sol a diminué dans les horizons superficiels du sol. Le prélèvement d'eau par les arbres a donc été déplacé vers les horizons plus profonds où l'eau était encore disponible. Cependant, l'enrichissement isotopique lié aux traceurs isotopiques diminue rapidement avec la profondeur (Figure IX-7). Pour obtenir 100% du prélèvement mesuré de ²⁶Mg et ⁴⁴Ca, il semble évident que le prélèvement de magnésium et de calcium était découplé du prélèvement d'eau.

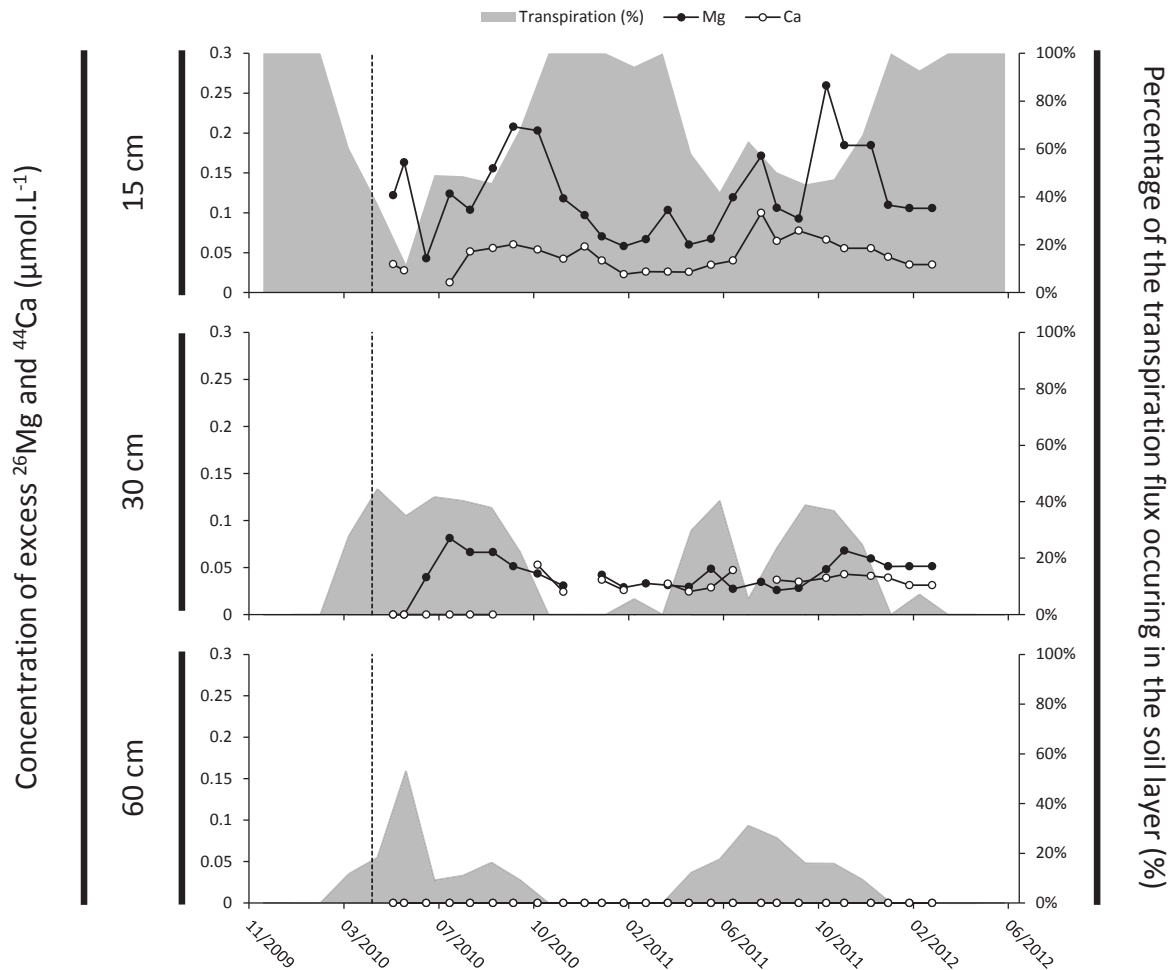


Figure IX-7 : Suivi des concentrations en ²⁶Mg and ⁴⁴Ca (µmol.L⁻¹) dans les solutions de sol échantillonnées avec des bougies poreuses (moyenne de 4 répétitions) et le flux transpiratoire dans les différentes couches de sol autour des bougies poreuses à 15 cm, 30 cm et 60 cm de profondeur pendant les deux ans de suivi après l'apport des traceurs. Les lignes verticales en pointillés représentent l'apport des traceurs.

Les résultats de la modélisation du prélèvement de magnésium et de calcium basé sur la composition chimique et isotopique des solutions de sol et le flux de transpiration a permis néanmoins de mettre en évidence l'importance des solutions de sol dans les horizons superficiels puisque la plus grande part des processus de la nutrition des arbres et des cycles biogéochimiques se produit dans ces horizons (minéralisation de la matière organique, prélèvement...). Cependant, échantillonner les solutions de sol entre 0 et 10 cm de profondeur est relativement difficile : les eaux gravitaires peuvent être échantillonnées mais l'échantillonnage non-destructif des eaux même faiblement liées est difficile.

II.4.3. Cartographie verticale du prélèvement des traceurs par l'arbre

En modélisant cette fois-ci le prélèvement de traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca à partir du prélèvement de magnésium et de calcium et des enrichissements isotopiques dans la litière au sol et dans les différentes couches de sol, nous avons pu prédire 100% du prélèvement mesuré de ^{26}Mg et ^{44}Ca et cartographier le prélèvement de magnésium et de calcium dans le profil de sol (Figure IX-8). Les résultats de l'expérience de traçage isotopique et de la modélisation montrent tout d'abord que la contribution de la couche de litière au sol à travers ses réserves échangeables est une des sources principales de magnésium et de calcium pour la nutrition des arbres et que le prélèvement est réalisé directement dans cette couche. En effet, de 82% à 94% du prélèvement de magnésium et de 35% à 65% du prélèvement de calcium est réalisé dans cette couche de litière. Les horizons superficiels ont probablement aussi largement contribué au prélèvement : jusqu'à 18% pour le magnésium et jusqu'à 46% pour le calcium.

Les profils verticaux de prélèvement de magnésium et de calcium sont différents. En effet, le magnésium a essentiellement été prélevé dans les horizons de surface. Les horizons en dessous de 2.5 cm de profondeur n'ont contribué qu'à hauteur de 0% à 7% du prélèvement total. La contribution des horizons profonds au prélèvement de calcium était en revanche plus importante : les horizons en dessous de 15 cm ont contribué à hauteur de 10 à 35% du prélèvement total.

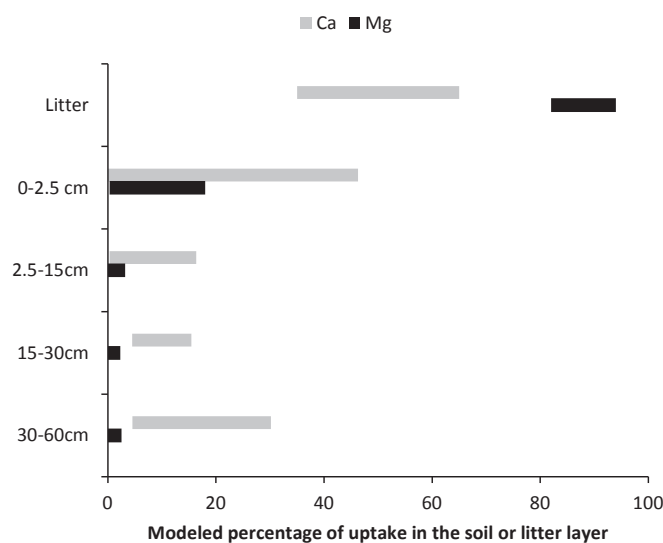


Figure IX-8 : Profils verticaux de prélèvement de Mg et de Ca modélisés dans le profil de sol (pourcentage de prélèvement dans chaque couche de litière et de sol: 0-2.5cm, 2.5-5cm and 5-60cm). Les intervalles des différentes solutions au système d'équation sont représentés par les barres horizontales.

Le prélèvement de calcium dans les couches profondes de sol est en accord avec l'hypothèse d'un cycle biogéochimique conservatif du calcium. Vejre and Hoppe (1998) ont décrit ce phénomène de "base-pump effect". En prélevant le calcium dans les horizons profonds, les arbres « concentrent » le calcium dans l'horizon organique et dans les horizons superficiels limitant ainsi les pertes de calcium (Nowak *et al.*, 1991; Fisher, 1995; Dijkstra and Smits, 2002; Brandtberg *et al.*, 2004). Cependant, une importante contribution des horizons profonds au flux de prélèvement semble improbable.

- i. Les stocks échangeables de calcium en dessous de 10 cm de profondeur ne sont que d'environ 24 kg.ha⁻¹ soit 1.5 années de prélèvement total (immobilisation + chute de litière) de calcium.
- ii. Le transfert vertical de calcium étant globalement très lent (§ II.3), il est peu probable que les flux de calcium dans les pluvolessivats et les flux de libération de calcium de la litière au sol puissent compenser les pertes des stocks échangeables qu'engendreraient un important prélèvement profond.
- iii. Le flux d'altération minérale estimé par PROFILE étant très faibles et en accord avec les très faibles teneurs en calcium des analyses totales de la terre fine et du substrat géologique, un flux de libération de calcium par altération minérale ne compenserait pas non plus les pertes.

Une importante contribution des couches profondes de sol était nécessaire pour que le modèle puisse reproduire à la fois le prélèvement de calcium et le prélèvement de ⁴⁴Ca. Les couches profondes de sol n'étant pas enrichies en ⁴⁴Ca, deux hypothèses sont envisageables :

- i. Le prélèvement de calcium total est surestimé (recyclage de calcium interne à la plante)
- ii. Les arbres ont prélevés du calcium dans une source de calcium proche de l'abondance isotopique naturelle autre que les couches profondes de sol (absorption foliaire de calcium)

Le profil vertical de prélèvement de magnésium semble en revanche contrasté avec certaines hypothèses établies sur le fonctionnement des cycles biogéochimiques du magnésium (§I.2.1). En effet, si le flux de libération de magnésium par altération minérale est un des principaux flux d'intrants à l'écosystème alors un prélèvement de magnésium dans les couches de sol profondes serait attendu. Il est possible que le flux de libération de Mg par altération minérale utile à la plante soit réalisé dans les horizons superficiels du sol, là où le mat racinaire est plus dense (activation de l'altération dans la rhizosphère (Turpault *et al.*, 2009)). Cependant, un prélèvement de magnésium essentiellement superficiel est cohérent avec les faibles réserves échangeables de magnésium : la nutrition magnésienne reposerait en très grande partie sur le recyclage des nutriments dans l'écosystème (cycle biologique).

Les résultats de la modélisation du profil vertical de prélèvement de magnésium et de calcium dans le profil de sol ont mis en évidence (1) un découplage du prélèvement de l'eau et du prélèvement de cations nutritifs et (2) un découplage du prélèvement de magnésium et du prélèvement de calcium.

II.5. Translocation des racines vers la canopée

II.5.1. Les vaisseaux du xylème sont une colonne chromatographique

Bien que l'absorption racinaire des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca ait été observée rapidement après l'expérience de multi-traçage isotopique, aucun enrichissement isotopique ($\delta^{26}\text{Mg}$ et $\delta^{44}\text{Ca}$) lié aux traceurs n'a été observé dans les feuilles vertes durant la première saison de végétation (2010) (Figure IX-9). Durant la seconde saison de végétation (2011), de faibles enrichissements $\delta^{26}\text{Mg}$ ont été mesurés dans quelques échantillons de feuilles vertes. Par contre, aucun enrichissement $\delta^{44}\text{Ca}$ n'a été observé. En revanche, de très forts enrichissements isotopiques ont été observés dans les feuilles vertes pour le traceur ^{15}N dès le mois suivant l'apport des traceurs (mai 2010) (Figure IX-9). L'enrichissement $\delta^{15}\text{N}$ des feuilles vertes est ensuite resté élevé durant les deux ans suivant l'apport des traceurs.

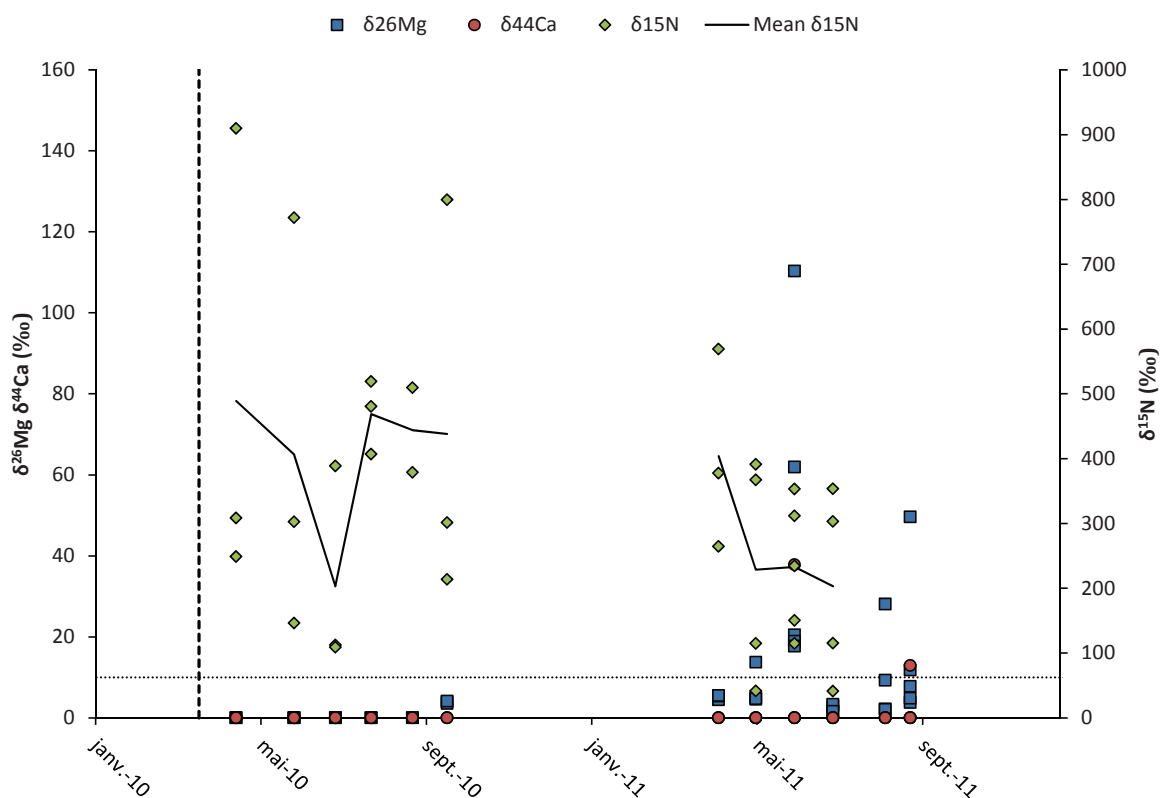


Figure IX-9 : Suivi de l'enrichissement isotopique (^{15}N , ^{26}Mg , ^{44}Ca) des feuilles vertes au cours de la période d'étude (avril 2010-mars 2012). La ligne en pointillés verticale représente l'apport des traceurs. La ligne en pointillés horizontale représente la limite de détection analytique des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca .

La translocation du magnésium et du calcium des racines vers la canopée est vraisemblablement un processus très lent. La cartographie des traceurs dans le tronc (Figure IX-10) et la canopée (Table IX-3) est en accord avec cette assertion. Le décalage temporel observé entre la translocation de l'azote et des cations nutritifs peut être en partie expliquée par les différences de vitesses de transfert dans la couche de litière et dans le sol ($^{15}\text{NO}_3 \gg ^{26}\text{Mg}$ et ^{44}Ca).

Cependant, ce décalage est très probablement lié à des processus différents de transport dans les vaisseaux du xylème.

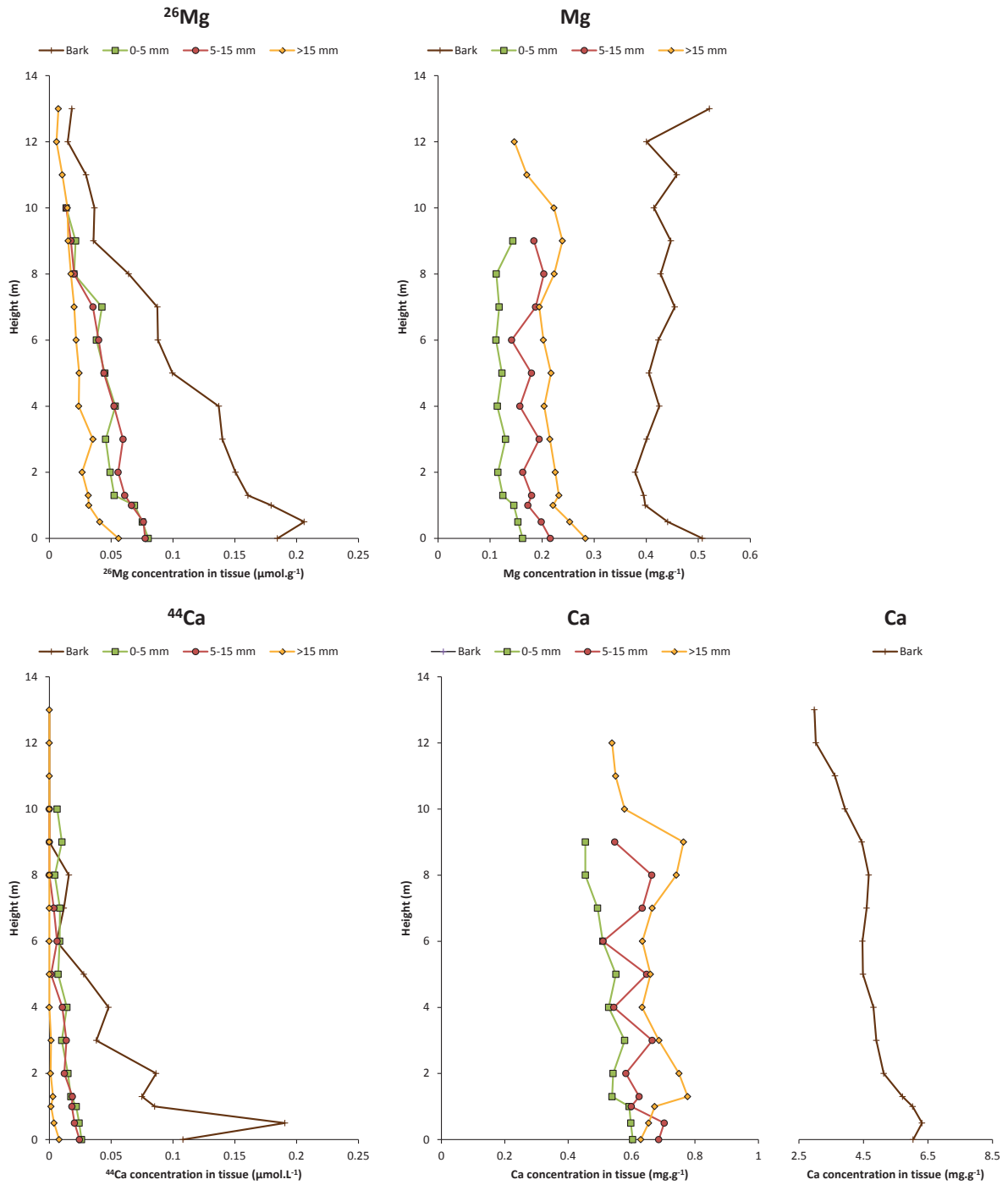


Figure IX-10 : Concentration moyenne des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca et de Mg et Ca dans les tissus du tronc (écorce et bois : 0-5mm, 5-15mm, >15mm) en fonction de la hauteur.

Les vaisseaux du xylème développe une grande capacité d'échange cationique dans les parois cellulaires qui composent les parois des vaisseaux et sont donc comparables à une colonne chromatographique (Biddulph *et al.*, 1959; Biddulph *et al.*, 1961; Bell and Biddulph, 1963; Shear and Faust, 1970; Vandegeijn and Petit, 1979). Dans la sève brute l'azote se trouve sous forme organique ou sous forme de nitrate (Marschner, 1995). Ces formes chimiques sont soit chargées négativement soit électriquement neutre. Ainsi le flux d'azote dans la sève brute est probablement relié au flux de transpiration d'eau (flux de masse) avec peu ou pas d'interaction avec les parois des vaisseaux du xylème.

Le calcium, ayant une plus forte affinité que le magnésium pour la capacité d'échange cationique de la matière organique (Salmon, 1964; André and Pijarowski, 1977; Baes and Bloom, 1988; Ponette *et al.*, 1997; Curtin *et al.*, 1998; DeSutter *et al.*, 2006), aurait été plus fortement retenu le long des vaisseaux du xylème. Une part du calcium a aussi pu précipiter sous forme d'oxalate de calcium (Nakata, 2003; Franceschi and Nakata, 2005). Les résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique ne sont pas en accord avec l'hypothèse d'un transport de calcium et de magnésium dans la sève brute sous forme de complexes organiques (Bradfield, 1976; Schell, 1997). Vue les faibles vitesses de transfert, il semblerait que le principal processus soit l'échange d'ions de proche en proche. Le nouveau calcium et magnésium prélevé déplacerait ainsi le calcium et magnésium déjà présent sur l'échangeur, permettant ainsi l'ascension progressive de ces éléments dans les vaisseaux du xylème. Augusto *et al.* (2011) ont trouvé des résultats très similaires en marquant des plants de pin sylvestre avec une solution isotopiquement enrichie en ^{15}N , ^{26}Mg et ^{42}Ca .

Compartment	Branche width	$\delta^{26}\text{Mg}$ (‰)		$\delta^{44}\text{Ca}$ (‰)	
		Wood	Bark	Wood	Bark
treetop	<1cm	11.6		<10	
Canopy 1/3	<1cm	14.8		<10	
	1-2cm	24.8	23.0	<10	<10
	2-4cm				
Canopy 2/3	<1cm	12.5		<10	
	1-2cm	19.9	17.2	<10	<10
	2-4cm	26.2	24.1	<10	<10
Canopy 3/3	<1cm	18.0		<10	
	1-2cm	20.3	19.0	<10	<10
	2-4cm	25.1	25.8	<10	<10

Table IX-4 : Enrichissement isotopique moyen des différents tissus ligneux de la canopée (bois et écorce) en fonction du diamètre des branches et de la hauteur dans la canopée.

III. Test des bilans de flux « entrées-sorties » par dilution isotopique

La dilution isotopique a été utilisée avec des isotopes stables ou radioactifs dans de nombreuses disciplines pour estimer des tailles de pools et/ou des flux d'éléments entre les pools (von Hevesy and Hofer, 1934; Forbes and Perley, 1951; Willison *et al.*, 1998; Cookson and Murphy, 2004; Achat *et al.*, 2009a; Achat *et al.*, 2009b; Stroud *et al.*, 2011). Cependant, ces études se sont focalisées sur un compartiment ou un pool particulier. La mesure de l'enrichissement isotopique de ce compartiment ou pool a été faite directement à partir d'un échantillon représentatif.

Dans le cadre de l'expérience de multi-traçage isotopique dans la placette de hêtre, la théorie de la dilution isotopique a été appliquée à l'écosystème entier (sol et arbres) de manière à estimer l'évolution des différents pools de magnésium et de calcium depuis 2001. L'estimation de l'enrichissement isotopique de l'écosystème entier est rendue difficile puisque les différents pools ou compartiments ont été subdivisés pour les mesures d'enrichissement isotopique de manière à suivre le plus finement possible le transfert des traceurs d'un compartiment à un autre ou au sein d'un compartiment. Par exemple, le profil de sol (0-70 cm) a été divisé en couche de sol de 2.5 ou 5 cm d'épaisseur. L'enrichissement isotopique de l'écosystème entier est donc estimé par la moyenne des concentrations des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca de chaque pool de l'écosystème pondérée par la taille de chaque pool. Cependant, les tailles des différents pools de magnésium et de calcium dans l'écosystème étaient les inconnues que l'on cherchait à déterminer. Plusieurs hypothèses d'évolutions des pools de magnésium et de calcium depuis 2001 ont été envisagées et pour chaque hypothèse un enrichissement théorique et expérimental a été calculés de manière à tester les différentes hypothèses.

La théorie de la dilution isotopique appliquée à l'échelle de l'écosystème entier a ainsi permis de valider les pertes en magnésium estimées par les bilans de flux « entrées-sorties » (Table IX-1). La diminution des stocks de magnésium dans le profil de sol peut avoir eu lieu dans les pools de magnésium dans la couche de litière au sol et/ou dans les pools échangeables du sol. Cependant, il semblerait que le pool de magnésium dans la couche de litière n'ait pas diminué depuis 2001. En effet, la taille de ce pool a été validée en appliquant la théorie de la dilution isotopique au système « litière au sol » le lendemain de l'apport des traceurs isotopiques.

La dilution isotopique du traceur ^{44}Ca dans l'écosystème entier a mis en évidence que les stocks de calcium dans le sol et dans la couche de litière au sol n'ont pas diminué depuis 2001. Les bilans de flux « entrées-sorties » de calcium ne seraient donc pas négatifs (Table IX-1) mais à l'équilibre. Un ou plusieurs flux entrants ou sortants ont donc été mal-estimés ou non pris en compte :

- v. Sous-estimation des apports atmosphériques de calcium ;
- vi. Sous-estimation du flux de libération de calcium par altération minérale ;
- vii. Surestimation de l'immobilisation dans la biomasse (recyclage interne à la plante de calcium ou prélèvement profond donc immobilisation surestimée dans le profil de sol 0-60cm).
- viii. Surestimation des pertes par drainage

Les pertes de calcium par drainage ($1.4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) ne peuvent pas compenser en totalité les bilans de calcium calculés ($-3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$). Deux ans après l'apport du traceur ^{44}Ca , et en l'absence d'expériences complémentaires, les mesures de dilution isotopique ne permettent pas de d'identifier le ou les flux sur ou sous-estimés parmi les différentes hypothèses retenues. Cependant une surestimation du drainage ou de l'immobilisation affecterait logiquement autant le Mg que le Ca et signifieraient alors que les dépôts de Mg et/ou l'altération ont été surestimés.

IV. Bilans des traceurs isotopiques dans l'écosystème

Deux ans après l'apport des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca , $102.0\pm 11.3\%$ du ^{26}Mg et $100.2\pm 18\%$ du ^{44}Ca apportés ont été retrouvés (Figure IX-11) dans les différents compartiments de l'écosystème (litière au sol, pool échangeable du sol, biomasse microbienne du sol et biomasse ligneuse).

La plus grande part des traceurs est retenue dans le profil de sol : $8.0\pm 3.0\%$ du ^{26}Mg et $32.8\pm 8.6\%$ du ^{44}Ca dans la litière au sol, $49.5\pm 2.5\%$ du ^{26}Mg et $47.1\pm 14.0\%$ du ^{44}Ca dans les pools échangeables du sol, $16.7\pm 5.9\%$ du ^{26}Mg immobilisés dans la biomasse microbienne. Dans le profil de sol, les traceurs ont été retenus dans les couches de sol superficielles : $34.8\pm 2.8\%$ du ^{26}Mg et $38.1\pm 10.5\%$ du ^{44}Ca dans la couche 0-5 cm et $17.6\pm 4.4\%$ du ^{26}Mg et $7.6\pm 4.7\%$ du ^{44}Ca dans la couche 5-10 cm. Enfin, $27.6\pm 9.0\%$ du ^{26}Mg et $20.4\pm 5.6\%$ du ^{44}Ca étaient immobilisés dans la biomasse ligneuse.

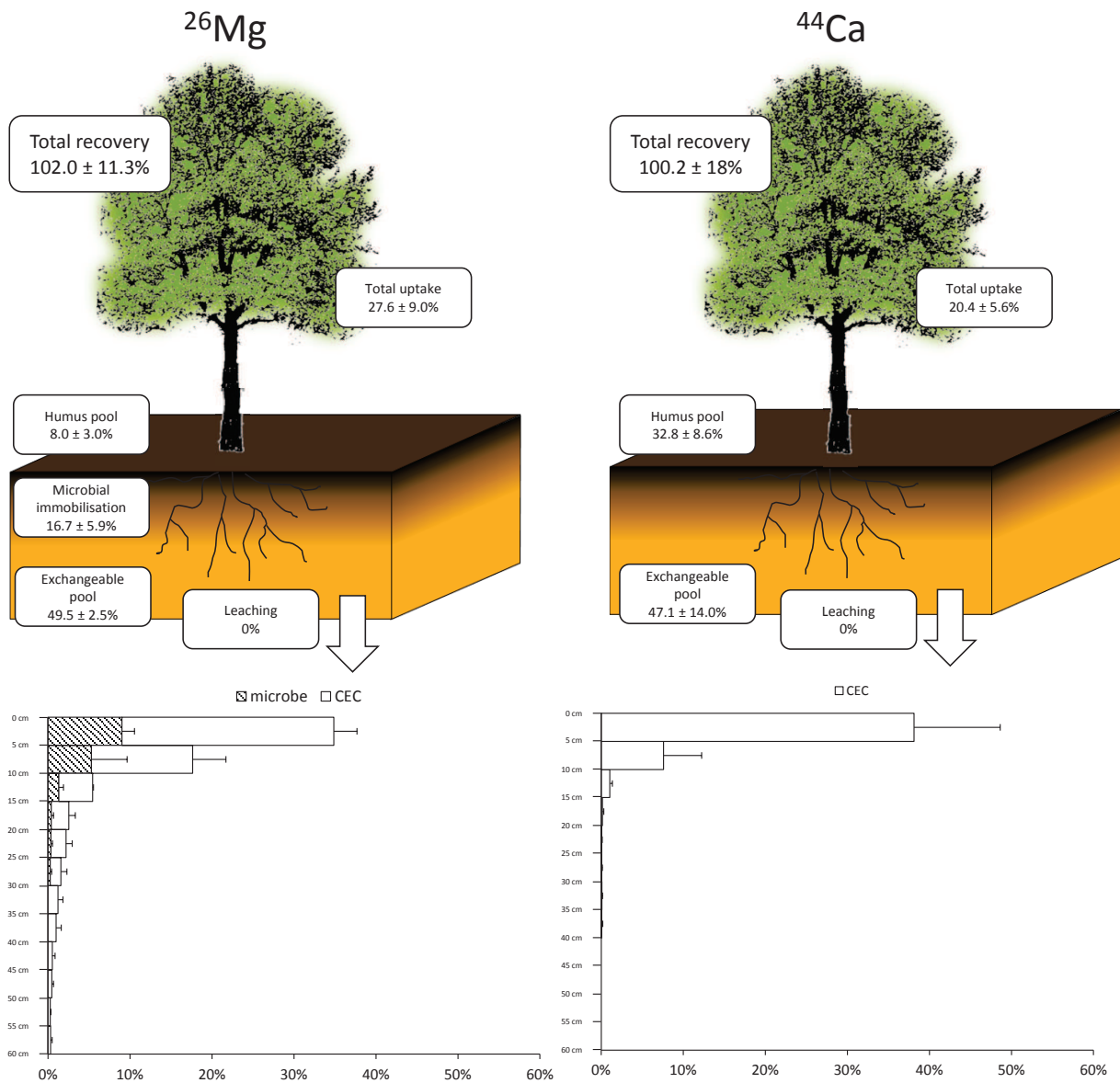


Figure IX-11 : Bilans des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans les différents compartiments de l'écosystème, deux ans après l'apport des traceurs. Les pools de traceurs dans chaque compartiment sont exprimés en pourcentage du traceur appliqué. La répartition verticale des traceurs dans le sol est présentée dans les graphiques.

V. Conclusions

L'apport des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca a permis de marquer efficacement (enrichissement isotopique fortement supérieure à la limite de détection analytique) les différents pools de l'écosystème (litière au sol, sol, biomasse aérienne). Le suivi de l'incorporation des traceurs isotopiques aux cycles biogéochimiques et la dilution isotopique des traceurs au cours des deux ans suivant l'apport des traceurs a permis de mettre en évidence :

- i. L'incorporation lente des entrées de magnésium et de calcium dans les cycles biogéochimiques
- ii. Le rôle primordial de la litière au sol dans les cycles du calcium et du magnésium : rétention des entrées et source majeure pour le prélèvement par les arbres
- iii. Les différents types de transfert de calcium et de magnésium dans le sol
- iv. Les différences entre les cycles du magnésium et du calcium
- v. Une diminution des stocks de magnésium dans le sol entre 2001 et 2012 ($0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) en accord avec les bilans de flux « entrées-sorties » calculés sur la période 2003-2008
- vi. Un équilibre des réserves de calcium dans le sol entre 2001 et 2012 alors que les bilans de flux « entrées-sorties » indiquaient une perte de calcium ($3.1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$)

Les résultats de ce travail de thèse ont permis des avancées dans la compréhension théorique du fonctionnement minéral de cet écosystème à faible fertilité minérale. Ces résultats permettent néanmoins d'établir des préconisations pour la gestion sylvicole de ce type d'écosystème.

Les écosystèmes forestiers à faible fertilité minérale sont très sensibles aux exportations minérales. La forte diminution des stocks de magnésium échangeables du sol sur la période 1974-2001 aurait probablement été réduite si les rémanents d'exploitation et l'humus n'avaient pas été exportés de la placette par andainage. Cette pratique sylvicole avant plantation est courante et, sans apports par amendement, impacte déjà et pourrait fortement réduire la fertilité chimique des sols sur le long-terme. Par exemple, une étude des besoins nutritifs des peuplements forestiers dans le massif du Morvan est en cours et débouchera probablement sur des amendements calco-magnésienne comme dans le département des Vosges.

Les résultats de ce travail de thèse ont mis en évidence le rôle important de la matière organique du sol dans les cycles biogéochimiques des cations nutritifs. Dans un contexte d'intensification des pratiques sylvicoles et de changements climatiques, une diminution des stocks de carbone du sol est possible ce qui impacterait les pools de cations nutritifs dans les sols (contribution de la matière organique à la CEC totale du sol). Dans un tel contexte, il est donc important de ne pas appliquer une gestion sylvicole trop intensive à ces écosystèmes.

Les résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique montrent un décalage temporel entre les stocks du sol et la biomasse aérienne. En effet, la translocation du magnésium et du calcium des racines vers la canopée est lente. La prise en compte de ce décalage temporel est importante pour éviter une mauvaise interprétation des diagnostics de fertilité et de nutrition des arbres (souvent réalisés à partir d'analyses de sol et de concentrations foliaires). Par

exemple, il est probable d'observer un décalage temporel entre une intervention anthropique ou une perturbation de l'écosystème et les conséquences de ces évènements sur la nutrition des arbres. Les résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique montrent également à travers l'apparente lenteur des transferts de magnésium et de calcium l'importance de l'échelle de temps pour l'étude de l'impact d'un évènement (opération sylvicole, perturbation...) sur l'évolution des stocks de ces nutriments dans l'écosystème.

L'ensemble de ces travaux souligne l'intérêt de l'approche « traçage isotopique » pour compléter les approches conventionnelles et étudier les flux et les pools d'éléments minéraux dans cet écosystème forestier à faible fertilité minérale. Nous avons pu au cours de ce travail de thèse répondre à certaines questions et hypothèses initiales, et les résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique ont soulevés d'autres questions, d'autres problématiques et d'autres hypothèses qui méritent d'être explorées. Le traçage isotopique utilisant les isotopes stables du magnésium et du calcium étant un outil très puissant et cet outil n'ayant que très peu été utilisé pour étudier les cycles biogéochimiques forestiers, de nombreuses expériences sont envisageables pour approfondir nos connaissances sur le fonctionnement minéral des écosystèmes forestiers à faible fertilité minérale.

VI. Perspectives

VI.1. Couplage des cycles du magnésium et du calcium avec le cycle de l'azote

Notre compréhension du couplage des cycles biogéochimiques des différents éléments minéraux est encore aujourd'hui incomplète. Cependant, quelques travaux ont pu mettre en évidence l'importance de l'interaction des cycles pour expliquer les dynamiques observées. Sur le site expérimental de Breuil-Chenué dans le peuplement de douglas (*Pseudotsuga menziesii*), l'apport d'un amendement (N, P et K en 1979 puis Ca et P en 1983) a fortement influencé le cycle de l'azote dans le sol : les concentrations de nitrate dans les solutions du sol sous le peuplement amendé étaient bien inférieures aux concentrations observées sous le peuplement témoin (non-amendé).

Le traceur isotopique de l'azote (^{15}N) avait été appliqué sous forme $^{15}\text{NO}_3$ lors de l'expérience de multi-traçage isotopique en avril 2010. La problématique du couplage du cycle de l'azote avec les cycles de l'eau, du magnésium et du calcium dépassait les objectifs de ce travail de thèse. Cependant, les enrichissements isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ ont été analysés dans la plupart des échantillons mais restent à être interprétés. Ces résultats permettraient d'étudier :

- i. Les vitesses de transfert de l'azote dans le sol (couplage au flux de drainage d'eau) ;
- ii. L'incorporation de l'azote sous forme nitrate dans les cycles de l'azote ;
- iii. Les différentes dynamiques de l'azote, du magnésium et du calcium dans l'arbre.

VI.2. Modélisation de l'expérience de traçage et dilution isotopique

Au cours de la thèse, un modèle simple à réservoir et à flux (Isomod) a été développé pour simuler le transfert vertical de Mg et de Ca dans le profil de sol. Les résultats de ce modèle montrent que les processus en jeu sont plus complexes que ceux implémentés et nous arrivons aux limites de ce modèle simples à réservoir et à flux. Cependant, il est évident que dans un système si complexe, l'outil de modélisation est indispensable pour tester des hypothèses, comprendre les différents processus en jeu et pouvoir à terme simuler plus précisément les cycles biogéochimiques du Mg et Ca.

Dans le cadre d'un projet postdoctoral et en collaboration avec Salim Belyazid de l'Université de Lund (Suède), le modèle biogéochimique ForSAFE sera utilisé pour simuler les cycles biogéochimiques des éléments minéraux (base de données de Breuil-Chenué de 2003 à 2008) et sera développé de manière à simuler les transferts de traceurs isotopiques et la dilution isotopique des traceurs initialement apportés. Ce travail de modélisation permettra de tester différentes hypothèses et de mettre en avant les qualités ou les défauts de ce type de modèle de simulation des cycles biogéochimiques.

VI.3. Suivi de la placette expérimentale sur le moyen-terme

L'apport de matériel enrichi en ^{26}Mg et en ^{44}Ca a permis de marquer significativement et durablement différents pools de l'écosystème. Le suivi de la placette de traçage se poursuivra sur le moyen-terme (10 ans) ce qui permettra de :

- i. Quantifier le temps de résidence du magnésium et du calcium de la pluie dans le sol et quantifier la contribution de ces entrées à la croissance des arbres (immobilisation) et la contribution aux pertes par drainage ;
- ii. Suivre la dilution isotopique du matériel enrichi apporté dans les différents compartiments de l'écosystème afin d'estimer les flux entrant et sortant de ces différents compartiments (par exemple : flux d'altération) ;
- iii. Etudier la vitesse du cycle biologique en suivant la translocation des traceurs des racines vers les feuilles ;
- iv. Un enrichissement isotopique progressif des feuilles vertes est attendu. Cet enrichissement sera peut-être assez important pour permettre d'étudier les potentiels flux d'absorption/récrétion foliaire et recyclage interne à la plante avant abscission des feuilles.

VI.4. Les « entrées » de magnésium et de calcium dans l'écosystème

L'expérience de multi-traçage *in situ* à l'échelle de l'écosystème permet d'étudier les cycles du magnésium et du calcium en limitant les biais liés à l'expérimentation. Cependant, les résultats de cette expérience montrent que (1) les flux de traceurs dans l'écosystème sont lents et (2) la mise en évidence et la quantification de certains flux sont rendues difficiles par la complexité des interactions entre les différents compartiments. Ces flux pourraient être étudiés par des expériences de traçage dédiées, à échelle fine *in* ou *ex situ*.

VI.4.1. Essai de quantification *ex situ* du flux d'altération

Une expérience *ex situ* de percolation de sol a été réalisée après avoir préalablement marqués les pools échangeables de magnésium et de calcium. Le sol a été prélevé entre 40 et 70 cm (où le taux de carbone dans le sol est faible <1%) dans le peuplement de forêt native sur le site expérimental de Breuil-Chenu en 2011. Le sol a ensuite été tamisé à 2 mm avant d'être marqué à l'aide d'une solution enrichie en ^{26}Mg et ^{44}Ca . 80 réacteurs contenant chacun 200g de terre fine ont été constitués. Les réacteurs de sol ont été percolés à vitesse lente pendant 3 mois à température constante (20°C). L'effet du pH (pH 3.8 et 4.5) et de la vitesse de percolation (0.02 mL.min⁻¹ et 0.04 mL.min⁻¹) a été testé. En suivant à la fois les sorties de magnésium et de calcium (élément total et composition isotopique) et le pool échangeable du sol, la théorie de la dilution isotopique peut être appliquée pour mesurer les entrées par altération des minéraux du sol. Les analyses de suivi des eaux drainant des réacteurs et des pools échangeables ont été réalisées mais des analyses supplémentaires des pools échangeables du sol sont requises pour mieux caractériser l'évolution de ces pools. Des analyses totales de la terre fine et des analyses de la minéralogie par diffraction aux rayons X peuvent être envisagées pour étudier l'évolution des minéraux du sol au cours de l'expérience de percolation.

VI.4.2. Expérience d'absorption foliaire

Une entrée de magnésium et de calcium dans les cycles biogéochimiques actuellement non prise en compte est l'absorption foliaire. Des expériences de traçage du calcium utilisant l'isotope radioactif ^{45}Ca ont permis de montrer que le calcium peut être absorbé par les feuilles mais reste immobilisé dans les feuilles (Bukovac and Wittwer, 1957; Chishaki *et al.*, 2007). L'expérience de Chishaki *et al.* (2007) montre cependant chez *Vicia Faba* L. (féverolle) que le calcium absorbé au niveau de la tige est mobile dans la plante. De nombreuses études ont aussi démontré que le magnésium peut être directement absorbé par les feuilles (Wittwer and Teubner, 1959; Schimansky, 1988).

L'estimation de l'absorption foliaire par l'approche « conventionnelle » (Ulrich, 1983) sera comparée aux résultats d'une expérience de multi-traçage isotopique *in situ* de l'absorption foliaire. Cette expérience de traçage isotopique consistera en la pulvérisation d'une solution enrichie en ^{26}Mg , ^{44}Ca et ^{15}N sur les feuilles vertes de quelques branches sélectionnées. Le ^{15}N peut être utilisé comme un traceur de l'absorption foliaire puisque l'azote est rapidement absorbé par les feuilles (Zeller *et al.*, 1998). La comparaison des deux approches (« conventionnelle » et « isotopique ») permettra d'améliorer la connaissance des échanges foliaires avec la pluie et ainsi de mieux quantifier les apports par dépôts atmosphériques.

Par ailleurs, la translocation des traceurs des racines vers les feuilles dans les arbres de la placette expérimentale étant lente et de forts enrichissements isotopiques des feuilles vertes n'étant pas certains, un marquage des feuilles au ^{26}Mg et au ^{44}Ca pourrait être réalisé à une échelle plus fine. Si une absorption foliaire significative pour Ca et Mg est mise en évidence par l'expérimentation détaillée ci avant, le marquage des feuilles par pulvérisation de solution enrichie en ^{26}Mg et ^{44}Ca pourrait être réalisé sur de jeunes hêtres sur un site voisin du site de Breuil-Chenue (« Breuil 2 ») en suivant un protocole similaire aux marquages au ^{15}N .

VI.5. Matière organique et cycles du magnésium et du calcium

VI.5.1. Pool échangeable de la litière au sol

Pour expliquer la rétention des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans la couche de litière au sol, nous avons avancé l'hypothèse d'une rétention sur la capacité d'échange cationique de la matière organique. Cette hypothèse demande à être validée.

Un protocole d'extraction de la CEC de l'humus, inspiré des protocoles d'extraction de la CEC du sol, a été appliqué aux échantillons de litière au sol prélevés durant les deux de suivi de la placette après l'expérience de multi-traçage : 2.5 g de l'échantillon sec de litière broyé a été agité pendant 1h avec une solution d'acétate d'ammonium (1 mol.L^{-1}). La composition isotopique de ces extractions reste encore à être mesurée. Ces résultats permettraient de mieux caractériser les dynamiques de rétention et de libération du magnésium et du calcium.

VI.5.2. Cartographie des traceurs à l'échelle micro ou nanométrique

Les instruments de mesures à haute résolution spatiale de type NanoSIMS et MicroSIMS ont beaucoup été développés ces dernières années et permettent aujourd'hui de mesurer à une échelle micro ou nanométrique des rapports isotopiques. Hatton (2012) a, par exemple, pu tracer à l'échelle des agrégats de sol l'azote (^{15}N) issu de la décomposition de la litière. Différentes approches (NanoSIMS et STXM/NEXAFS) ont aussi été combinées de manière à mesurer à la fois les rapports isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$) et déterminer la spéciation de la matière organique d'une particule de sol ou d'une particule de litière (Remusat *et al.*, 2012). Ces mesures peuvent être envisagées sur les échantillons prélevés au cours de l'expérience de multi-traçage isotopique pour déterminer les liaisons entre les traceurs (^{26}Mg et ^{44}Ca) et la matière organique (groupements fonctionnels retenant les traceurs, précipités minéraux) et minérale à la fois dans la litière au sol et le profil de sol.

VI.5.3. Expérience de décomposition de litière

Une production de litière marquée au ^{26}Mg et ^{44}Ca est attendue dans la placette de traçage sur le site de Breuil-Chenu. Comme expliqué précédemment, si l'expérience d'absorption foliaire est concluante, il sera possible de marquer des feuilles de hêtre *ex situ*. Une expérience de décomposition de litière marquée permettrait de quantifier les vitesses de libération de calcium et magnésium de la litière et quantifier l'importance de ce flux dans le prélèvement annuel par les arbres. Une expérience de traçage isotopique *ex situ* de ce type a été réalisée par Weatherall *et al.* (2006a) sur des jeunes plants d'épicéa de Sitka.

Dans un premier temps, une expérience *ex situ* de décomposition de litière marquée pourrait être envisagée dans des conditions contrôlées (contrôle des entrées de magnésium et de calcium par la pluie) pour éviter une trop forte dilution isotopique du flux de libération de magnésium et de calcium de la litière. De forts enrichissements dans la litière n'étant pas attendus, une expérience *in situ* de décomposition de litière marquée est également envisageable mais nécessiterait des méthodes d'analyses isotopiques plus précises (MC-ICP-MS ou TIMS). Ces expériences pourraient par la suite être réalisées dans des écosystèmes fortement instrumentés et suivis sur le long-terme comme les placettes de niveau 3 du réseau RENECOFOR. L'intérêt majeur de ce type de réseau est qu'il couvre une très large gamme d'écosystèmes forestiers (essences, climat, altitude, sol, fertilité...) et permettrait de comprendre les différents facteurs de contrôle des processus de libération des cations nutritifs de la litière.

VI.6. Recyclage de magnésium et de calcium interne à l'arbre

Une mobilisation du magnésium et du calcium immobilisés dans le tronc de l'arbre pour alimenter les organes en croissance est une des hypothèses pour expliquer les différences observées entre les bilans de flux « entrées-sorties » et l'évolution des stocks échangeables du sol (§III.). La mise en évidence et la quantification de tels processus est difficile à l'échelle de l'arbre.

Une expérience de traçage sur des jeunes plants de hêtre peut être envisagée (*in situ* sur le site de « Breuil 2 » ou *ex situ*) en marquant par exemple les feuilles (§ VI.4.2) et en suivant les traceurs après abscission des feuilles dans la chute de litière et les organes ligneux de l'arbre (rameaux, tronc). La remobilisation interne à la plante de calcium et de magnésium pourrait être mise en évidence en plaçant les arbres dans des conditions de forte demande nutritive pour un

ou plusieurs nutriments et en suivant l'évolution des concentrations de ce ou ces nutriments dans les différents tissus de l'arbre au cours du temps.

VI.7. Applicabilité de la technique de dilution isotopique pour estimer des évolutions de stocks dans les sols de placettes permanentes

Comme précédemment discuté dans la synthèse, démontrer des changements de réserves de nutriments dans les sols est difficile. Cette information reste néanmoins très importante pour comprendre et prédire l'évolution des écosystèmes à faible fertilité minérale. Les résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique ont montré la puissance de la technique de dilution isotopique pour mesurer les évolutions des stocks de nutriments dans les différents compartiments de l'écosystème. Cependant, l'utilisation de matériel isotopiquement enrichi est très onéreuse. Il serait envisageable d'appliquer la technique de dilution isotopique à d'autres écosystèmes en appliquant moins de matériel isotopiquement enrichi et en utilisant des méthodes d'analyses isotopiques plus précises (MC-ICP-MS ou TIMS) avec un échantillonnage beaucoup moins fréquent (annuel ou biannuel). Ces expériences ne permettraient pas d'étudier finement les flux de calcium et de magnésium dans l'écosystème mais pourraient permettre d'évaluer l'évolution des pools de nutriments au cours du temps. Ces essais pourraient être réalisés dans des écosystèmes fortement instrumentés et suivis sur le long-terme comme les placettes de niveau 3 du réseau RENECOFOR.

VI. Références

- Achat, D.L., Bakker, M.R., Augusto, L., Saur, E., Dousseron, L., Morel, C., 2009a. Evaluation of the phosphorus status of P-deficient podzols in temperate pine stands: combining isotopic dilution and extraction methods. *Biogeochemistry* 92, 183-200.
- Achat, D.L., Bakker, M.R., Morel, C., 2009b. Process-Based Assessment of Phosphorus Availability in a Low Phosphorus Sorbing Forest Soil using Isotopic Dilution Methods. *Soil Sci Soc Am J* 73, 2131-2142.
- André, J.P., Pijarowski, L., 1977. Cation exchange properties of sphagnum peat: exchange between two cations and protons. *Journal of Soil Science* 28, 573-584.
- Arocena, J.M., Velde, B., Robertson, S.J., 2011. Weathering of biotite in the presence of arbuscular mycorrhizae in selected agricultural crops. *Applied Clay Science*.
- Augusto, L., Zeller, B., Midwood, A.J., Swanston, C., Dambrine, E., Schneider, A., Bosc, A., 2011. Two-year dynamics of foliage labelling in 8-year-old *Pinus pinaster* trees with (^{15}N) , (^{26}Mg) and (^{42}Ca) -simulation of Ca transport in xylem using an upscaling approach. *Ann For Sci* 68, 169-178.
- Baes, A.U., Bloom, P.R., 1988. Exchange of Alkaline Earth Cations in Soil Organic Matter. *Soil Science* 146, 6-14.
- Barber, S.A., 1995. Soil nutrient bioavailability : a mechanistic approach. Wiley, New York [etc.].
- Bell, C.W., Biddulph, O., 1963. Translocation of Calcium. Exchange versus Mass Flow. *Plant physiology* 38, 610-614.
- Bens, O., Buczko, U., Sieber, S., Huttli, R.F., 2006. Spatial variability of O layer thickness and humus forms under different pine beech-forest transformation stages in NE Germany. *J. Plant Nutr. Soil Sci.-Z. Pflanzenernahr. Bodenkd.* 169, 5-15.
- Biddulph, O., Cory, R., Biddulph, S., 1959. Translocation of Calcium in the Bean Plant. *Plant physiology* 34, 512-519.
- Biddulph, O., Nakayama, F.S., Cory, R., 1961. Transpiration stream & ascension of calcium. *Plant physiology* 36, 429-436.
- Bolou-Bi, E.B., Vigier, N., Poszwa, A., Boudot, J.P., Dambrine, E., 2012. Effects of biogeochemical processes on magnesium isotope variations in a forested catchment in the Vosges Mountains (France). *Geochim Cosmochim* 87, 341-355.
- Bradfield, E.G., 1976. Calcium complexes in the xylem sap of apple shoots. *Plant Soil* 44, 495-499.
- Brandtberg, P.O., Bengtsson, J., Lundkvist, H., 2004. Distributions of the capacity to take up nutrients by *Betula* spp. and *Picea abies* in mixed stands. *Forest Ecol Manag* 198, 193-208.
- Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil-nitrogen - A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.* 17, 837-842.
- Brookes, P.C., Powlson, D.S., Jenkinson, D.S., 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. Biochem.* 14, 319-329.
- Bukovac, M.J., Wittwer, S.H., 1957. Absorption and Mobility of Foliar Applied Nutrients. *Plant physiology* 32, 428-435.
- Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Frey-Klett, P., 2006. Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1258-1266.
- Castellano, S.D., Dick, R.P., 1991. Modified calibration procedure for the measurement of microbial sulfur in soil. *Soil Sci Soc Am J* 55, 283-285.
- Chishaki, N., Yuda, K., Inanaga, S., 2007. Differences in mobility of calcium applied to the aboveground parts of broad bean plants (*Vicia faba* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 53, 286-288.
- Cookson, W.R., Murphy, D.V., 2004. Quantifying the contribution of dissolved organic matter to soil nitrogen cycling using ^{15}N isotopic pool dilution. *Soil Biol Biochem* 36, 2097-2100.
- Curtin, D., Selles, F., Steppuhn, H., 1998. Estimating Calcium-Magnesium Selectivity in Smectitic Soils from Organic Matter and Texture. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 1280-1285.
- DeSutter, T.M., Pierzynski, G.M., Baker, L.R., 2006. Flow-through and batch methods for determining calcium-magnesium and magnesium-calcium selectivity. *Soil Sci Soc Am J* 70, 550-554.
- Dijkstra, F.A., Smits, M.M., 2002. Tree species effects on calcium cycling: The role of calcium uptake in deep soils. *Ecosystems* 5, 385-398.
- Ericsson, K., 2004. Bioenergy policy and market development in Finland and Sweden. *Energy policy* 32, 1707-1721.
- Farkaš, J., Déjeant, A., Novák, M., Jacobsen, S.B., 2011. Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca^{2+} in a base-poor forest: A new concept of combining stable ($\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$) and radiogenic (ϵCa) signals. *Geochim Cosmochim* 75, 7031-7046.

- Fisher, R.F., 1995. Amelioration of degraded rain-forest soils by plantations of native trees. *Soil Sci Soc Am J* 59, 544-549.
- Forbes, G.B., Perley, A., 1951. Estimation of total body sodium by isotopic dilution. I. Studies on young adults. *The Journal of clinical investigation* 30, 558-565.
- Franceschi, V.R., Nakata, P.A., 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. In, *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 41-71.
- Hansson, K., Olsson, B.A., Olsson, M., Johansson, U., Kleja, D.B., 2011. Differences in soil properties in adjacent stands of Scots pine, Norway spruce and silver birch in SW Sweden. *Forest Ecol Manag* 262, 522-530.
- Hatton, P.J., 2012. Séquestration du carbone et de l'azote des feuilles de hêtre dans les associations organo-minérales: Approches macroscopiques, nanométriques & moléculaires. *AgroParisTech, AgroParisTech, Nancy*, 186
- Jongmans, A.G., vanBreemen, N., Lundstrom, U., vanHees, P.A.W., Finlay, R.D., Srinivasan, M., Unestam, T., Giesler, R., Melkerud, P.A., Olsson, M., 1997. Rock-eating fungi. *Nature* 389, 682-683.
- Legout, A., Nys, C., Picard, J.F., Turpault, M.P., Dambrine, E., 2009. Effects of storm Lothar (1999) on the chemical composition of soil solutions and on herbaceous cover, humus and soils (Fougères, France). *Forest Ecol Manag* 257, 800-811.
- Legout, A., Walter, C., Nys, C., 2008. Spatial variability of nutrient stocks in the humus and soils of a forest massif (Fougères, France). *Ann For Sci* 65, 108-article 108.
- Lequy, E., Conil, S., Turpault, M.P., 2012. Impacts of Aeolian dust deposition on European forest sustainability: A review. *Forest Ecol Manag* 267, 240-252.
- Lorenz, N., Verdell, K., Ramsier, C., Dick, R.P., 2010. A Rapid Assay to Estimate Soil Microbial Biomass Potassium in Agricultural Soils. *Soil Sci Soc Am J* 74, 512-516.
- Malajczuk, N., Cromack, K., 1982. ACCUMULATION OF CALCIUM-OXALATE IN THE MANTLE OF ECTOMYCORRHIZAL ROOTS OF PINUS-RADIATA AND EUCALYPTUS-MARGINATA. *New Phytol* 92, 527-531.
- Mareschal, L., 2008. Effet des substitutions d'essences forestières sur l'évolution des sols et de leur minéralogie : bilan après 28 ans dans le site expérimental de Breuil (Morvan). *Ressources Procédés Produits Environnement, Université Henri Poincaré, Nancy*, 328
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic, London.
- Nakata, P.A., 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164, 901-909.
- Nowak, C.A., Downard, R.B., White, E.H., 1991. Potassium trends in red pine plantations at Pack-Forest, New-York. *Soil Sci Soc Am J* 55, 847-850.
- Oliver, S., Barber, S.A., 1966. An Evaluation of the Mechanisms Governing the Supply of Ca, Mg, K, and Na to Soybean Roots (Glycine max)1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 30, 82-86.
- Olsson, B.A., Bengtsson, J., Lundkvist, H., 1996. Effects of different forest harvest intensities on the pools of exchangeable cations in coniferous forest soils. *Forest Ecol Manag* 84, 135-147.
- Oren, R., Schulze, E.D., Werk, K.S., Meyer, J., 1988. Performance of two *Picea abies* (L.) Karst. stands at different stages of decline. *Oecologia* 77, 163-173.
- Ponette, Q., Dufey, J.E., Weissen, F., 1997. Downward movement of dolomite, kieserite or a mixture of CaCO₃ and kieserite through the upper layers of an acid forest soil. *Water Air Soil Pollut.* 95, 353-379.
- Proe, M.F., Midwood, A.J., Craig, J., 2000. Use of stable isotopes to quantify nitrogen, potassium and magnesium dynamics in young Scots pine (*Pinus sylvestris*). *New Phytol* 146, 461-469.
- Puech, J., 2009. Mise en valeur de la forêt française et développement de la filière bois. Paris, 75
- Remusat, L., Hatton, P.J., Nico, P.S., Zeller, B., Kleber, M., Derrien, D., 2012. NanoSIMS Study of Organic Matter Associated with Soil Aggregates: Advantages, Limitations, and Combination with STXM. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3943-3949.
- Saggar, S., Bettany, J.R., Stewart, J.W.B., 1981. Measurement of microbial sulfur in soil. *Soil Biol. Biochem.* 13, 493-498.
- Salmon, R.C., 1964. Cation exchange reactions. *Journal of Soil Science* 15, 273-283.
- Schell, J., 1997. Interdependence of pH, malate concentration, and calcium and magnesium concentrations in the xylem sap of beech roots. *Tree Physiol* 17, 479-483.
- Schimansky, C., 1988. Comparative investigations on leaf uptake of magnesium using solutions containing 28Mg

- Vergleichende Untersuchungen über die Blattaufnahme von Magnesium aus 28Mg-haltigen Applikationslösungen. Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung 38, 5-9.
- Sentenac, H., Grignon, C., 1981. A model for predicting ionic equilibrium concentrations in cell-walls. *Plant physiology* 68, 415-419.
- Shear, C.B., Faust, M., 1970. Calcium transport in apple trees. *Plant physiology* 45, 670-674.
- Sparling, G.P., West, A.W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C - Calibration insitu using microbial respiration and ¹⁴C leabeled cells. *Soil Biol. Biochem.* 20, 337-343.
- Stroud, J.L., Khan, M.A., Norton, G.J., Islam, M.R., Dasgupta, T., Zhu, Y.-G., Price, A.H., Meharg, A.A., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., 2011. Assessing the Labile Arsenic Pool in Contaminated Paddy Soils by Isotopic Dilution Techniques and Simple Extractions. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4262-4269.
- Tate, K.R., Ross, D.J., Feltham, C.W., 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C - Effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.* 20, 329-335.
- Turpault, M.P., Nys, C., Calvaruso, C., 2009. Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma* 153, 147-154.
- Ulrich, B., 1983. Interaction of forest canopies with atmospheric constituents: SO₂, alkali and earth alkali cations and chloride. In: Ulrich, B., Pankrath, J. (Eds.), *Effects of accumulation of air pollutants in forest ecosystems*. D Reidel, Boston, pp. 33-45.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707.
- Vandegeijn, S.C., Petit, C.M., 1979. TRANSPORT OF DIVALENT-CATIONS - CATION-EXCHANGE CAPACITY OF INTACT XYLEM VESSELS. *Plant Physiology* 64, 954-958.
- Vejre, H., Hoppe, C., 1998. Distribution of Ca, K, Mg, and P in acid forest soils in plantations of *Picea abies* - Evidence of the base-pump effect. *Scandinavian Journal of Forest Research* 13, 265-273.
- von Hevesy, G., Hofer, E., 1934. Die verweilzeit des wassers im menschlichen körper, untersucht mit hilfe von "schwerem" wasser als indicator. *Klinische Wochenschrift* 13, 1524.
- Weatherall, A., Proe, M.F., Craig, J., Cameron, A.D., McKay, H.M., Midwood, A.J., 2006a. Tracing N, K, Mg and Ca released from decomposing biomass to new tree growth. Part I: A model system simulating harvest residue decomposition on conventionally harvested clearfell sites. *biomass Bioenergy* 30, 1053-1059.
- Weatherall, A., Proe, M.F., Craig, J., Cameron, A.D., Midwood, A.J., 2006b. Internal cycling of nitrogen, potassium and magnesium in young Sitka spruce. *Tree Physiol* 26, 673-680.
- Willison, T.W., Baker, J.C., Murphy, D.V., Goulding, K.W.T., 1998. Comparison of a wet and dry ¹⁵N isotopic dilution technique as a short-term nitrification assay. *Soil Biol Biochem* 30, 661-663.
- Wittwer, S.H., Teubner, F.G., 1959. Foliar absorption of mineral nutrients. *Annual review of plant physiology* 10, 13-30.
- Zeller, B., Colin-Belgrand, M., Dambrine, E., Martin, F., 1998. ¹⁵N partitioning and production of ¹⁵N-labelled litter in beech trees following [¹⁵N] urea spray. *Ann For Sci* 55, 375-383.

Liste des figures

Chapitre I : Introduction générale

- Figure I-1:** Schéma récapitulatif des principaux flux d'éléments chimiques dans les écosystèmes forestiers (adapté de Legout 2008) 21
- Figure I-2 :** Coupes transversale et longitudinale d'une racine décrivant les mouvements des cations de la solution externe aux vaisseaux conducteurs de la plante. Extrait de Bolou Bi (2009)..... 22
- Figure I-3 :** Carte de répartition des formations boisées en France par type d'essences (FCBA 2012) 24
- Figure I-4 :** Evolution des émissions d'oxydes de soufre et d'azote à l'échelle de la France entre 1960 et 2011 (CITEPA) 25
- Figure I-5 :** Cartes de la répartition des formations boisées en France (FCBA 2009) et de la sensibilité des sols aux exportations minérales. La carte de sensibilité des sols aux exportations minérales (Nicolas et al. 2007) a été réalisée par Alain Brêthes, Jean-Paul Party, Jean-Claude Gégout, Etienne Dambrine et Manuel Nicolas 27
- Figure I-6 :** Comparaison des variations isotopiques naturelles mesurées dans différents matériaux et réservoirs de magnésium (Bolou-Bi et al. 2009; Brenot et al. 2008; de Villiers et al. 2005; Pogge von Strandmann et al. 2008; Teng et al. 2007; Tipper et al. 2006a; 2008a; Tipper et al. 2006b; Wiechert and Halliday 2007; Young and Galy 2004). Extrait de Bolou Bi (2009) 35
- Figure I-7 :** Synthèse des variations isotopiques naturelles du calcium ($\delta^{44}\text{Ca}$) dans les différents réservoirs sur les continents (Amini et al. 2009; Bullen and Bailey 2005; Cenki-Tok et al. 2009; Chu et al. 2006; DePaolo 2004; Ewing et al. 2008; Farkaš et al. 2011; Hindshaw et al. 2011; Holmden and Bélanger 2010; Marshall and Depaolo 1982; Page et al. 2008; Perakis et al. 2006; Schmitt et al. 2003; Schmitt and Stille 2005; Skulan and DePaolo 1999; Tipper et al. 2006a; Wiegand et al. 2005; Zhu and Macdougall 1998). Extrait de Cobert (2012)..... 36
- Figure I- 8:** Théorie de la dilution isotopique..... 39

Chapitre II : Matériels et méthodes

- Figure II-1 :** Plan du site expérimental de Breuil-Chenue 56
- Figure II-2 :** Plan des équipements de suivi dans la placette de hêtre de Breuil-Chenue..... 58
- Figure II-3 :** Expérience de traçage multi-isotopique sur la placette de hêtre du site expérimental de Breuil-Chenue. (1) Quadrillage de maille 1m^2 de la zone de 80m^2 pour pulvériser au sol le traceur de manière homogène, (2) Bâche protectrice autour de la zone de 80m^2 pour éviter de contaminer les placettes voisines, (3) pulvérisation de la solution de traçage, (4) apport d'une lame d'eau déminéralisée, (5) la zone de 80m^2 entourée d'un filet pour récupérer la chute de litière de l'automne 2010, (6) les arbres de la placette ont été emballés individuellement dans un filet pour récupérer la chute de litière de l'automne 2011..... 59
- Figure II-4:** Schéma récapitulatif des différents suivis, échantillonnages, opérations sylvicoles et méthodes analytiques dans la placette de hêtre. 61
- Figure II-5 :** Plan de la placette de traçage n°1 et localisation des arbres échantillonnés pour mesurer la quantité de ^{26}Mg et ^{44}Ca prélevée au cours des deux ans après l'apport des traceurs isotopiques. Les arbres sont représentés par les disques blanc numérotés, la taille des disques représente la circonférence relative des arbres..... 63
- Figure II-6 :** Schéma récapitulatif du protocole d'échantillonnage des arbres abattus lors de l'éclaircie en 2012. 64

Chapitre III : Traçage et modélisation du cycle de l'eau

Figure III-1 : Mean monthly rainfall intensity computed over the 2006-2010 period at the Breuil-Chenué site expressed as the proportion of monthly rainfall: from 0 to 10, 10 to 20 and over 20 mm per day. Mean monthly soil volumetric water content (%) was computed over the 2006-2010 period from the TDR probes at 15cm depth (continuous line), soil water content at field capacity and at the wilting point are represented by the dotted lines. 79

Figure III-2 : Comparison of monthly weather data records measured at the Breuil-Chenué experimental site and two METEO-FRANCE weather stations (Quarré-les-tombes at 9km from the Breuil-Chenué site for RF; Chateau-Chinon for PET at 28km) over the 2006-2011 period for (a) rainfall (RF) and (b) potential evapotranspiration (PET) records..... 81

Figure III-3 : Artificially deuterated water tracing elution peaks in the soil monitored by a ZTL at 10 cm depth and TCL at 15, 30 and 60cm depth plotted against time. Concentrations were standardized with the elution peak maximum (C/C_{max}) of each replicate. Rainfall and soil volumetric water content are also represented: rainfall is expressed in $\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$ and monitored soil volumetric water content is expressed in percent. 82

Figure III-4 : Deuterium input-output budgets (expressed in percent of applied tracer) computed with BILJOU outputs from the different models: MB(100%RF) and MB(PF Xmm/h). Scenarios are detailed in Table III-2..... 83

Figure III-5 : Cumulated nutrient leaching fluxes ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$) at 60 cm depth over 2010-2011 against the cumulated percolated water flux (mm) calculated for calcium, magnesium and nitrate using BILJOU water drainage flux outputs from the different models: NLF(100%RF) and NLF(PF Xmm/h). Scenarios are detailed in Table 2. The dotted vertical lines represent the limits of the vegetation seasons (April to September)..... 84

Chapitre IV : Approches « conventionnelles » des cycles biogéochimiques et de l'évolution des réserves de Ca et de Mg du sol dans la placette de hêtre

Figure IV-1 : Map of the Breuil-Chenué experimental site: localization of the different stands and soil samplings in 1974 and in 2001..... 101

Figure IV-2 : A schematic description of silvicultural operations and sampling in the beech plot from 1974 to 2008 103

Figure IV-3 : Comparison of soil CEC extracted base cations (Mg, Ca and K) and soil carbon content between 1974 and 2001. CEC extracted base cations are expressed in $\text{cmolc}\cdot\text{kg}^{-1}$ and carbon content in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Error bars are standard deviations calculated for the soil sample replicates (spatial variability). 104

Figure IV-4 : Wet atmospheric deposition of SO_4 , Mg, Ca and K at the RENECOFOR-DOU71 monitoring site over the 1993-2009 period and at the Breuil-Chenué site over the 2003-2008 period. Fluxes are expressed in $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{yr}^{-1}$. 105

Figure IV-5 : Soil solution pH and concentration monitoring for major elements (SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Al^{3+}) in the beech plot of the Breuil-Chenué site over the 2003-2008 period at 15 and 60cm depth. Concentrations are expressed in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cations were given positive values and anions negative values..... 106

Figure IV-6 : Mg and Ca mean annual fluxes between ecosystem pools. Fluxes were expressed relatively to the soil CEC exchangeable pool (Flux/soil CEC pool size) to assess exchangeable Mg and Ca pool turnover. Above-ground biomass and organic layer pool sizes are expressed in $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ and in relative size (pool size/ soil CEC pool size)..... 107

Figure IV-7 : Foliar concentrations (N, P, K, Ca and Mg) monitored over the 2002-2007 period. Concentrations were standardized by the deficiency level defined by Bonneau (1995). The dotted line represents the deficiency level for each element..... 107

Chapitre V : Développement méthodologique pour l'analyse des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ par ICP-MS. Premiers résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique

Figure V-1 : Influence of sample concentration (2.a) and isotope enrichment (2.b) on measured mass bias factors. Standards of different concentrations were made from NIST standards and standards of different isotopic composition were made from ^{26}Mg and ^{44}Ca spiked NIST standards at 100 ppb Mg or Ca on both ICP-MS (Agilent and Bruker). 125

Figure V-2 : Bland-Altman plots for measuring agreement in instrument comparison. Differences between the Mg and Ca isotope ratios measured on Bruker 820MS and Agilent 7500CE are plotted against the mean value of both measurements. Dotted lines represent the upper and lower 95% limits of agreement ($\text{mean} \pm 1.96\text{SD}$) and the mean difference..... 126

Figure 1: A schematic description of IsoMod, a model to predict the labeling of the soil layers and isotopic dilution of the initial spike with time. A description of variable names is given in Table 3..... 140

Figure 2: Modeled and measured isotopic composition ($\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$; ‰) of the soil CEC Mg and Ca pools one year after the tracing experiment (March 2011). Modeled isotopic compositions are represented with empty squares and a dotted line, measured isotopic composition of the soil CEC Mg and Ca pools with full squares and a continuous line. Isotopic composition in soil solutions sampled at the same date as the soil samples (zero-tension lysimeter at 0 and 10cm depth, and tension-cup lysimeter at 15, 30 and 60cm depth) are represented with full circles. Error bars represent standard deviations computed from soil sample and soil solution replicates. 141

Figure 3: Bulk fine root isotopic composition ($\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$; ‰) plotted against soil CEC Mg and Ca pools isotopic composition and soil solution isotopic composition over the first year after the tracing experiment and over a range of depths (from 0 to 45cm). The dotted line represents 1:1 line. 142

Chapitre VI : Transfert vertical des traceurs dans le profil de sol

Figure VI-1: Total excess ^{26}Mg and ^{44}Ca pools in the litter-layer during the two years after the tracing experiment plotted against cumulated matrix water flow since the application of tracers (mm) (van der Heijden et al., accepted Geoderma) expressed in percentage of applied tracers. Error bars are standard deviations at each sampling date. Correspondence between sampling dates and cumulated matrix water flow is given in Table VI-3. 161

Figure VI-2: Excess ^{26}Mg in the litter-layer, and in the soil exchangeable and microbial biomass pools in the different soil layers (0-5 cm, 5-15 cm and 15-60 cm) during the two years after the tracing experiment expressed in percentage of applied tracers. Error bars represent standard deviations..... 162

Figure VI-3: Excess ^{44}Ca in the litter-layer, the soil exchangeable and microbial biomass pools in the different soil (0-5 cm, 5-15 cm and 15-60 cm) during the two years after the tracing experiment expressed in percentage of applied tracers. Error bars represent standard deviations. 163

Figure VI-4: Isotopic composition ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$) of soil solution collected with zero-tension lysimeters at 0 cm and 10 cm depth plotted against cumulated matrix water flow since the application of tracers (mm) (van der Heijden et al., accepted Geoderma). Crosses represent individual replicates and circles represent the mean value at each sampling date. Correspondence between sampling dates and cumulated matrix water flow is given in Table VI-3. 164

Figure VI-5: Isotopic composition ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$) of soil solution collected with tension-cup lysimeters at 15 cm depth plotted against cumulated matrix water flow since the application of tracers (mm) (van der Heijden et al., accepted Geoderma). The horizontal dotted line represents the analytical detection limit for excess ^{26}Mg and ^{44}Ca

(10‰) (van der Heijden et al., accepted Plant and Soil). Correspondence between sampling dates and cumulated matrix water flow is given in Table VI-3..... 165

Figure VI-6 : Isotopic composition ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{26}\text{Mg}$ and $\delta^{44}\text{Ca}$) of soil solution collected with tension-cup lysimeters at 30 cm depth plotted against cumulated matrix water flow since the application of tracers (van der Heijden et al., accepted Geoderma). The horizontal dotted line represents the analytical detection limit for excess ^{26}Mg and ^{44}Ca (10‰) (van der Heijden et al., accepted Plant and Soil). Correspondence between sampling dates and cumulated matrix water flow is given in Table VI-3..... 167

Figure VI-7: Summary of excess ^{26}Mg and ^{44}Ca pools in the organic and soil layers two years after the tracing experiment and calculated cumulated fluxes of excess ^{26}Mg and ^{44}Ca in the soil profile over the two years after the tracing experiment..... 169

Chapitre VII : Prélèvement et allocation des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans la biomasse aérienne des arbres

Figure VII-1: Schematic description of the biomass sampling protocol to measure ^{26}Mg and ^{44}Ca immobilization in above-ground tree organs during the two first years after the application of tracers..... 189

Figure VII-2: Monitoring of excess ^{26}Mg and ^{44}Ca concentrations in soil solutions ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) collected with tension-cup lysimeters (mean of 4 replicates) and the modeled proportion of the water transpiration flux (van der Heijden et al., accepted Geoderma) from the soil layer around the lysimeter at 15 cm, 30 cm and 60 cm depth during the two first years after the application of tracers. The vertical discontinuous line represents the application of tracers..... 192

Figure VII-3: Range of variation of modeled Mg and Ca uptake profiles (percentage of uptake in the different litter and soil layers: 0-2.5cm, 2.5-15cm 15-30cm and 30-60cm)..... 194

Figure VII-4: Isotopic composition of fine roots during the first year after the application of tracers (expressed in ‰).
..... 194

Figure VII-5 : Isotopic composition of leaves during two years after the application of tracers. The discontinuous vertical line represents the application of tracers. The discontinuous horizontal line represents the ^{26}Mg and ^{44}Ca analytical detection limit..... 195

Figure VII-6: Mean tracer ^{26}Mg and ^{44}Ca and total Mg and total Ca concentration in the different ligneous tissues of the bole (bark, wood: 0-5mm, 5-15mm and >15mm) (Figure VII-1) as a function of height (m)..... 196

Chapitre VIII : Bilans des traceurs dans l'écosystème deux ans après leur application

Figure VIII-1: Schematic description of the two hypotheses tested: (A) Soil exchangeable Mg and Ca pools have not decreased over the 2001-2012 period and (B) Soil exchangeable Mg and Ca pools have decreased following the trend suggested by nutrient input output budgets. Mg and Ca pool size in the different ecosystem compartments (soil, Litter-layer and tree biomass) in 2001 and in 2012 according to each hypothesis is given in the table..... 222

Figure VIII-2: Schematic description of the theoretical and experimental isotope enrichment calculation methodology
..... 223

Figure VIII-3: Differences between fumigated and unfumigated soil extractions for total element (Mg, Ca and K), expressed in g.kg^{-1} , and stable isotope tracers (^{26}Mg and ^{44}Ca) expressed in ‰. The dotted line is the 1:1 line..... 225

Figure VIII-4: Relation between whole-tree ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake (expressed in mmol of tracer) during the two years following the application of the tracer and tree circumference at breast height (mm). One sampled tree presented abnormally low tracer uptake and was considered as an outlier to fit allometric equations..... 226

Figure VIII-5: Hypotheses testing with the isotopic dilution technique. Theoretical and experimental isotope enrichments were computed for the whole ecosystem (Litter-layer, soil and tree biomass) according to different hypotheses on Mg and Ca pool change since 2001. Error bars are experimental isotope enrichment uncertainty

estimated with Monte-Carlo simulations. (*) notes a significant difference between theoretical and experimental isotope enrichments. 227

Figure VIII-6: ^{26}Mg and ^{44}Ca tracer total recovery and tracer distribution in ecosystem compartments two years after the application of tracers. ^{26}Mg and ^{44}Ca tracers are expressed in percentage of the applied tracer (mean \pm standard deviation). 228

Chapitre IX : Synthèse et conclusions générales

Figure IX-1 : Taux de renouvellement théorique des stocks de magnésium et de calcium échangeables du sol de chaque flux. La taille relative de chaque flux est exprimée en fonction du pool échangeable du sol (Flux/ pool échangeable du sol). Les pools de nutriments dans la biomasse aérienne et dans la litière au sol sont exprimés en $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ et en taille relative (pool / pool échangeable du sol). 243

Figure IX-2 : Importance potentielle des différents stocks de magnésium et de calcium dans l'écosystème représentée en nombre d'années d'immobilisation annuel dans la biomasse (stocks en $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ /immobilisation annuel $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) 244

Figure IX-3 : Comparaison de l'enrichissement isotopique $\delta^{26}\text{Mg}$ des pools microbien et échangeable du sol (0-30cm) sur l'ensemble de la période d'étude (avril 2010-mars 2012). La première bissectrice est représentée par la droite en pointillés. 247

Figure IX-4: Synthèse des différents types de flux de magnésium et de calcium dans le profil de sol en fonction du type de flux d'eau (matriciel ou préférentiel) et de la composition de la CEC (organique ou minérale) du matériau traversé. 250

Figure IX-5 : Comparaison de l'enrichissement isotopique $\delta^{26}\text{Mg}$ des racines fines au $\delta^{26}\text{Mg}$ du pool échangeable du sol et des solutions de sol sur l'ensemble de la période d'étude (avril 2010-mars 2012). La première bissectrice est représentée par la droite en pointillés. 251

Figure IX-6 : Comparaison de l'enrichissement isotopique $\delta^{26}\text{Mg}$ des racines fines au $\delta^{26}\text{Mg}$ des pools microbien et échangeable du sol sur l'ensemble de la période d'étude (avril 2010-mars 2012). La première bissectrice est représentée par la droite en pointillés. 252

Figure IX-7 : Suivi des concentrations en ^{26}Mg and ^{44}Ca ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dans les solutions de sol échantillonnées avec des bougies poreuses (moyenne de 4 répétitions) et le flux transpiratoire dans les différentes couches de sol autour des bougies poreuses à 15 cm, 30 cm et 60 cm de profondeur pendant les deux ans de suivi après l'apport des traceurs. Les lignes verticales en pointillés représentent l'apport des traceurs. 253

Figure IX-8 : Profils verticaux de prélèvement de Mg et de Ca modélisés dans le profil de sol (pourcentage de prélèvement dans chaque couche de litière et de sol: 0-2.5cm, 2.5-5cm and 5-60cm). Les intervalles des différentes solutions au système d'équation sont représentés par les barres horizontales. 254

Figure IX-9 : Suivi de l'enrichissement isotopique (^{15}N , ^{26}Mg , ^{44}Ca) des feuilles vertes au cours de la période d'étude (avril 2010-mars 2012). La ligne en pointillés verticale représente l'apport des traceurs. La ligne en pointillés horizontale représente la limite de détection analytique des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca 256

Figure IX-10 : Concentration moyenne des traceurs ^{26}Mg et ^{44}Ca et de Mg et Ca dans les tissus du tronc (écorce et bois : 0-5mm, 5-15mm, >15mm) en fonction de la hauteur. 257

Figure IX-11 : Bilans des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans les différents compartiments de l'écosystème, deux ans après l'apport des traceurs. Les pools de traceurs dans chaque compartiment sont exprimés en pourcentage du traceur appliqué. La répartition verticale des traceurs dans le sol est présenté dans les graphiques. 261

Liste des tableaux

Chapitre III : Traçage et modélisation du cycle de l'eau

Table III-1 : Description of the soil in the beech stand at the Breuil-Chenué experimental site. Values in brackets represent standard deviations..... 78

Table III-2 : Summary of the different scenarios simulated 80

Table III-3 : Computed water flow velocities using the maximum of elution peaks and water flow porosity computed from the inverse of water flow velocities for the four repetitions of TCL at 15, 30 and 60cm depth. Flow velocities are expressed in millimeters of tracer displacement per millimeter of percolated water (Throughfall-evapotranspiration) and water flow porosities are expressed in percentage of soil total volume..... 82

Table III-4 : BILJOU and HYDRUS-1D calibration using the TDR soil water content data set over the 2006-2010 period and an artificially deuterated water tracing experiment for the different models tested: 100%RF, RF<Xmm.h⁻¹ and PF(Xmm.h⁻¹). Scenarios are detailed in Table 2. Goodness of fit between predicted and measured soil water content values is expressed with mean error and root mean squared error at 15, 30 and 60 cm depth (computed over the vegetation seasons), TR deficit (transpiration deficit) is expressed as the cumulated difference between potential transpiration and simulated transpiration (mm) over 2010, differences between the occurrence of simulated and measured elution peaks (simulated-measured) is expressed in percolated millimeters at 15, 30 and 60 cm depth..... 83

Table III-5 : Nutrient leaching fluxes at 60 cm depth over 2010-2011 calculated for calcium, magnesium and nitrate using BILJOU water drainage flux outputs from the different models: NLF(100%RF) and NLF(PF Xmm.h⁻¹). Scenarios are detailed in Table III-2..... 84

Table III-6 : Comparison of total annual water drainage fluxes (mm.year⁻¹) at 60 cm depth simulated by two hydrological models (HYDRUS-1D and BILJOU) from the different models: 100%RF and RF<Xmm.h⁻¹. Scenarios are detailed in Table 2..... 85

Chapitre IV : Approches « conventionnelles » des cycles biogéochimiques et de l'évolution des réserves de Ca et de Mg du sol dans la placette de hêtre

Table IV-1 : Total element analysis (%) of the deep soil horizon and the "Pierre-qui-vire" granite bedrock (Dejou et al., 1977) 101

Table IV-2 : Breuil-Chenué experimental site soil description. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2mm diameter (mass of soil particles smaller than 2mm/total volume of soil). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC)..... 102

Table IV-3 : Available and total nutrient pool sizes in the beech plot at the Breuil-Chenué site. Available pools were estimated from soil extraction data (duchaufour for P and soil CEC extractions for base cations Mg, Ca and K). Total nutrient pools were estimated from soil total analysis. Nutrient pools in above-ground biomass were estimated with the mineralmass equations applied to the 2001 beech plot inventory and humus pools were estimated from total analysis of humus samples (Moukoumi, 2006). All pools are expressed in kg.ha⁻¹..... 102

Table IV-4 : Mean nutrient fluxes and input-output budgets computed over the 2003-2008 period in the beech plot at the Breuil-Chenué site. Missing values either weren't measured at the Breuil-Chenué site (S uptake) or were negligible (S and P weathering, and P atmospheric deposition and throughfall fluxes)..... 106

Chapitre V : Développement méthodologique pour l'analyse des rapports isotopiques $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ et $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ par ICP-MS. Premiers résultats de l'expérience de multi-traçage isotopique

Table V-1 : Précision, répétabilité et justesse des analyses isotopiques du Mg et du Ca avec un système Bruker 820MS exprimées en $\delta^{26}\text{Mg}$ et $\delta^{44}\text{Ca}$ (‰). 119

Table V-2 : Calcium and magnesium isotopic composition of ^{44}Ca and ^{26}Mg enriched standards made from ^{44}Ca and ^{26}Mg -spiked standards (calculated ratios)..... 123

Table V-3 : Instrument precision (P), repeatability (R), and accuracy (A) assessed for each sample type for the two ICP-MS instruments (Agilent 7500CE series and Bruker 820MS). "All samples" refers to Solution, CEC-extraction and Biomass digest samples. Precision was estimated by the standard deviation of measurement replicates of one analysis. For repeatability, each sample was analyzed 3 times on 3 different days. Isotope analysis accuracy (Error) was defined as the deviation (%) from TIMS measured ratio or certified ratio. Isotope ratios were corrected for mass bias using the double standard bracketing method..... 128

Table 1: Total element analysis of the granite bedrock at the Breuil-Chenu site (Mareschal 2008)..... 137

Table 2: Breuil-Chenu experimental site soil description. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2mm diameter (mass of soil particles smaller than 2mm/total volume of soil). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC)..... 138

Table 3: Summary of variables used in the IsoMod model to predict isotope dilution and vertical transfer of ^{26}Mg and ^{44}Ca in the soil profile. The isotopic composition column summarizes the model assumptions and isotopic composition is expressed in atom%..... 140

Chapitre VI : Transfert vertical des traceurs dans le profil de sol

Table VI-1: Breuil-Chenu experimental site soil description. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2mm diameter (mass of soil particles smaller than 2mm/total volume of soil). Organic CEC is the relative contribution of soil organic matter to soil total ECEC (expressed in %) and was estimate with equation (1) (Table VI-2). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC)..... 157

Table VI-2: Statistics for the fitted parameters of equation (1) predicting fine earth total CEC from soil carbon content (%) (b) and clay content (%) (c). Parameters were fitted with a linear regression model..... 157

Table VI-3: Summary of soil and litter sampling dates, number of replicates and depth sampled. The cumulated matrix water flow (mm) at each sampling date is also given (van der Heijden et al., accepted Geoderma)..... 159

Table VI-4: ^2H , ^{26}Mg and ^{44}Ca transfer velocity in the soil profile (mm of tracer displacement per mm of cumulated matrix water flow) (van der Heijden et al., accepted Geoderma). Transfer velocities were computed using the maximum of elution peaks in soil solutions collected at 15 cm and 30 cm with tension-cup lysimeters..... 166

Table VI-5: Calcium-Magnesium selectivity coefficients in different soils 170

Chapitre VII : Prélèvement et allocation des traceurs isotopiques ^{26}Mg et ^{44}Ca dans la biomasse aérienne des arbres

Table VII-1: Description of soil chemical and physical properties in the beech plot at the Breuil-Chenu experimental site. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2mm diameter (mass of soil particles smaller than

2mm/total volume of soil). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC)..... 185

Table VII-2: Summary of soil and litter sampling dates, number of replicates and depth sampled. 187

Table VII-3: Maximum contribution of the different soil solutions collected in the soil profile to ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake expressed in percentage of measure ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake. 191

Table VII-4: Maximum contribution of the different sources of Mg and Ca in the soil profile to ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake expressed in percentage of measure ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake. "Litter (Exch)" and "Litter (Bulk)" refer to the litter exchangeable Mg and Ca and litter total Mg and Ca pools respectively. 193

Table VII-5: Mean isotopic composition of the different ligneous tissues of the canopy (wood and bark) as a function of branch diameter and height in the canopy (1/3, 2/3 and 3/3) (Figure VII-1) 197

Table VII-6: ^{44}Ca isotopic composition of the different ligneous tissues of the bole (bark, wood: 0-5mm, 5-15mm and >15mm) and canopy (Bark and wood) as a function of bole height (m), or height in canopy and branch diameter (Figure VII-1). 207

Table VII-7: ^{26}Mg isotopic composition of the different ligneous tissues of the bole (bark, wood: 0-5mm, 5-15mm and >15mm) and canopy (Bark and wood) as a function of bole height (m), or height in canopy and branch diameter (Figure VII-1). 208

Chapitre VIII : Bilans des traceurs dans l'écosystème deux ans après leur application

Table VIII-1 : Breuil-Chenu experimental site soil description. Bulk density is given for the soil particles smaller than 2mm diameter (mass of soil particles smaller than 2mm/total volume of soil). Base saturation (BS) is expressed in percentage of the effective cationic exchange capacity (ECEC)..... 217

Table VIII-2: Differences between fumigated and unfumigated extractions for total element (Mg, Ca and K) and isotopic composition ($^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ and $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) tested by ANOVA for soil samples collected from 04/2010 to 04/2012. The p-value of the ANOVA tests is presented for each element and for each depth from 0 to 30cm depth.. 224

Table VIII-3: Linear regression model parameters for the allometric equations predicting whole-tree ^{26}Mg and ^{44}Ca uptake (mmol) from tree circumference at breast height (mm). 224

Résumé

De nombreux sols forestiers français sont acides et pauvres en éléments nutritifs et les forêts françaises font face aujourd'hui à des pressions extérieures croissantes. Ces nouvelles contraintes sont d'ordre nutritionnel et/ou sylvicole et/ou climatique et risquent d'impacter la durabilité des écosystèmes forestiers à faible fertilité minérale. Il est donc très important de comprendre et quantifier les processus qui régissent les cycles des éléments nutritifs dans ces écosystèmes afin de prédire au mieux leurs évolutions possibles face à de telles contraintes et ainsi aider les gestionnaires forestiers à prendre des décisions réfléchies pour assurer leur durabilité.

L'objectif principal de cette thèse était de comprendre le cycle du calcium et du magnésium dans un écosystème forestier productif bien que croissant sur un sol très faiblement pourvu en Ca et Mg. Pour cela, nous avons établi dans un peuplement de hêtre âgé de 35 ans des bilans de flux « entrées-sorties » basés sur des mesures classiques de pools et flux entre 2003 et 2008. Puis une expérience de multi-traçage isotopique (^2H , ^{15}N , ^{26}Mg et ^{44}Ca) a ensuite été conduite: les traceurs ont été apportés à la surface du sol en avril 2010 sous forme soluble et leur progression a été suivie dans l'écosystème jusqu'en mars 2012.

Les résultats ont mis en évidence le rôle primordial que joue la matière organique dans les cycles du Mg et du Ca, en leur conférant notamment un caractère très conservatif. Le ^{26}Mg et le ^{44}Ca apportés ont été captés dans la fine couche de litière au sol puis lentement libérés. Dans les horizons minéraux, la matière organique du sol, qui semble contribuer à la plus grande part de CEC du sol, a fortement contribué à ralentir la migration du Mg et du Ca à travers le sol. Par rapport au Mg, le calcium apporté a été plus intensément retenu dans la litière, et moins intensément lixivié à travers le sol en raison de sa plus grande affinité pour la matière organique.

Malgré les flux préférentiels d'eau mis en évidence par le traçage au ^2H , aucune perte par drainage de ^{26}Mg ou ^{44}Ca n'a été mesurée. Deux années après l'apport, il restait dans la litière 8% du ^{26}Mg et 33% du ^{44}Ca apportés tandis que, respectivement, 52% et 46% ont été retrouvés dans les 10 premiers cm du sol. Les traceurs, rapidement absorbés par les racines fines ont migré dans l'arbre à des vitesses très différentes: les feuilles étaient enrichies en ^{15}N dès le mois suivant l'apport des traceurs, tandis que seuls de très faibles enrichissements en ^{26}Mg (mais pas de ^{44}Ca) ont été mesurés dans la canopée en 2012. Le bilan en 2012 montre les arbres ont absorbé 27% de ^{26}Mg et 20% de ^{44}Ca et qu'ils sont majoritairement concentrés dans les tissus de la base du tronc.

L'utilisation de traceurs isotopiques a permis de mettre en évidence la lenteur de la redistribution de Mg et encore plus de Ca dans l'écosystème, d'une part de la litière vers les sols et d'autre part des racines vers les canopées. Ce comportement est attribué à l'affinité de ces ions pour les charges carboxyliques portées par la matière organique.

Enfin, la dilution isotopique mesurée dans les différents compartiments de l'écosystème à l'issue de deux années a permis de calculer des bilans et ainsi de valider les pertes de Mg calculées par l'approche classique de « bilan de fertilité minérale ». En revanche, les pertes de Ca calculées par cette même approche ont été mises en défaut, démontrant la contribution d'une source externe (absorption par les feuilles, altération...) ou interne (mobilisation du stock des tissus ligneux), non prise en compte dans l'approche classique.

L'ensemble de ces travaux souligne l'intérêt de l'approche « traçage isotopique » en complément des approches conventionnelles afin d'étudier la fertilité minérale des écosystèmes forestiers.

Mots clés : Cycles biogéochimiques, forêt, traçage isotopique, dilution isotopique, calcium, magnésium

Summary

Many forest soils in France are acid and nutrient poor. French forests endure today increased external constraints which may be nutritional and/or silvicultural and/or climatic. These constraints may strongly impact the sustainability of nutrient-poor ecosystems. It is thus important to understand and quantify the processes which govern nutrient cycling in these ecosystems to better predict soil fertility changes and help forest managers make sound decisions to sustain these ecosystems.

The main objective of this thesis was to study magnesium and calcium cycles in a productive forest ecosystem with low available magnesium and calcium pools in the soils. For this purpose, in a 35-year-old beech stand, we computed input-output nutrient budgets between 2003 and 2008 using conventional approaches to measure nutrient pools and fluxes. A multi-isotopic (^2H , ^{15}N , ^{26}Mg et ^{44}Ca) tracing experiment was then carried out in the same plot: tracers were sprayed on the forest floor in April 2010 as soluble salts, tracer transfer was then monitored in the whole ecosystem until March 2012 (litter-layer, exchangeable pools, soil solutions, above-ground biomass...).

The results evidenced the predominant role of organic matter in the very conservative cycling of Mg and Ca in this nutrient-poor soil. Indeed, the applied ^{26}Mg and ^{44}Ca were very rapidly retained in the fine litter-layer by ion-exchange processes. In the soil profile, most of the CEC was probably due to soil organic matter which played an important role in the retention of Mg and Ca in the soil. Compared to magnesium, calcium was more strongly retained in the litter layer and transferred more slowly in the soil profile because of the higher affinity of calcium for organic CEC. Despite preferential water flow evidenced by the water tracing experiment (^2H), no leaching of ^{26}Mg or ^{44}Ca was observed during the study period. Two years after the application of tracers, 8% of applied ^{26}Mg and 33% of applied ^{44}Ca was still retained in the litter layer while, respectively, 52% and 46% of applied tracers were found in the first 10cm of the soil profile. Tracers were rapidly absorbed by the fine roots but were transferred from the roots to the canopy at very different velocities: leaves were enriched in ^{15}N one month after the application of tracers while only very small ^{26}Mg enrichments and not ^{44}Ca were observed in the canopy in 2012. Tracer budgets in 2012 showed that trees absorbed 27% of ^{26}Mg and 20% of ^{44}Ca and that tracers were mainly concentrated at the base of the bole. The use of isotope tracers evidenced the slow distribution of magnesium and the slower distribution of calcium in the ecosystem, on the one hand from the litter pool to the soil profile and on the other hand from the roots to the canopy. This behavior was attributed to the affinity of the cations for organic matter functional groups such as carboxyl groups.

Finally the isotopic dilution technique of the applied tracers measured in the different ecosystem compartments after two years of monitoring enabled us to validate the Mg losses computed by nutrient budgets. However, Ca depletion suggested by nutrient budgets were proven to be nil thus evidencing the contribution of an external (foliar absorption, weathering) and/or internal (mobilization of nutrients stored in ligneous tissues) sources which are currently not taken into account in conventional approaches.

Overall the results of the *in situ* ecosystem scale multi-isotopic tracing experiment show the added value of the "isotopic tracing" approach to study nutrient pools and fluxes in forest ecosystems in addition to conventional approaches.

Keywords: Biogeochemical cycles, forest, isotopic tracing, isotopic dilution, calcium, magnesium