



Évaluation de la végétalisation et des communautés microbiennes d'un système agroforestier quatre ans après l'implantation sur les rejets miniers aurifères en région nordique canadienne

Mémoire

Chantal Giroux

Maîtrise en agroforesterie - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Chantal Giroux, 2021



Évaluation de la végétalisation et des communautés microbiennes d'un système agroforestier quatre ans après l'implantation sur les rejets miniers aurifères en région nordique canadienne

Mémoire

Chantal Giroux

Sous la direction de :

Damase P. Khasa, directeur de recherche
Chantal J. Beauchamp, codirectrice de recherche

Résumé

L'exploitation minière au Canada est d'une importance économique et sociale indéniable. Les industries minières produisent des résidus miniers qui peuvent contaminer les écosystèmes terrestres et aquatiques à court et à long terme. Cette étude porte sur la restauration écologique des déchets miniers aurifères dans le nord canadien, plus particulièrement dans le nord du Québec. L'objectif de ce mémoire est d'évaluer le potentiel de différents systèmes d'implantation pour la végétalisation d'un site minier dégradé en observant la survie des plantes, les paramètres physico-chimiques et les communautés microbiennes du sol quatre ans après leur implantation sur un site minier aurifère nordique. Le dispositif agroforestier a été réalisé sur un site de post-extraction d'or, sur des résidus fins, en utilisant un mélange d'espèces d'arbres et d'herbacées, l'amendement de microorganismes symbiotiques et de biochar. Les résultats ont montré un effet positif de l'inoculation sur la survie des arbres, en particulier pour les espèces *Alnus viridis* ssp. *Crispa* et *Picea glauca* avec des taux de survie supérieurs à 90 %. D'autre part, l'analyse des séquences de champignons et de bactéries dans le sol avec la technologie Illumina Miseq a permis d'évaluer la diversité des microorganismes et leur interaction dans l'environnement. La présence des bactéries du genre *Pseudomonas* et des ectomycorhizes des genres *Amphinema* et *Cadophora* montre que ces microorganismes sont adaptés à ce milieu et que leur utilisation comme inoculum est pertinente. Le biochar a un effet sur les paramètres chimiques du sol, en particulier le pH, le carbone et l'azote total. Ces paramètres ont finalement affecté les communautés microbiennes du sol. Ainsi, nos résultats suggèrent que la végétalisation des sites miniers dégradés peut être améliorée par l'implantation de végétaux inoculés avec des microorganismes symbiotiques et un amendement en biochar qui sont adaptés aux conditions édapho-climatiques.

Abstract

Mining in Canada is of undeniable economic and social importance. The mining industry produces tailings that may contaminate the soil and water ecosystems, causing long-term land degradation. This study focuses on the ecological restoration of gold mining wastes in the Canadian north, specifically in northern Quebec. The objective of this master thesis is to assess the potential of different implantation systems for the revegetation of a mine degraded land by assessing the survival of plants, the physicochemical parameters, and the microbial communities of the soil after four years. The field trials were established on gold post-mining sites on fine tailings, using a mixture of tree and herbaceous species, the amendment of symbiotic microorganisms, and biochar. This study has provided insight into the complexity of soil-plant-microorganism relationships. The results showed a positive effect of inoculation on the tree survival rate, especially for *Alnus viridis* ssp. *Crispa* and *Picea glauca* and their survival rate of over 90%. Moreover, the characterization of fungi and bacteria in the soil with the Illumina Miseq technology made it possible to assess the diversity of microorganisms and their interaction in the environment. Also, the presence of bacteria of the genus *Pseudomonas* and ectomycorrhizal fungi of the genera *Amphinema* and *Cadophora* suggest that these beneficial soil microorganisms are well adapted to this environment and can be used as inoculum. Biochar affects soil chemical parameters, especially pH, total carbon, and total nitrogen. These parameters ultimately affected the soil microbial communities. Thus, our results suggest that revegetation of degraded mine sites is possible with a combination of plants, amendments of biochar and, microsymbionts, adapted to edapho-climatic conditions.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements.....	ix
Introduction	1
Revue de littérature	3
La restauration écologique.....	3
La fertilité des sols.....	4
La phytoremédiation et les microorganismes.....	5
Le biochar	7
Chapitre 1 Évaluation de la végétalisation et des communautés microbiennes d'un système agroforestier quatre ans après l'implantation sur les rejets miniers aurifères en région nordique canadienne	8
Objectifs et hypothèses	8
Matériel et méthodes	9
Site d'étude et dispositif expérimental	9
Échantillonnage.....	10
Analyses physico-chimiques du sol	11
Analyse moléculaire des communautés microbiennes.....	11
Analyses bio-informatique	13
Analyses statistiques	14
Résultats	15
Analyses de croissance végétale	15
Analyses physico-chimiques des sols	16
Analyses des communautés bactériennes	17
Analyses des communautés fongiques	22
Discussion	27
Limites de l'étude.....	32
Conclusion	34
Bibliographie.....	36

Annexe A Figures supplémentaires 43

Liste des figures

Figure 1 Schéma présentant le bloc 1 contenant 12 unités expérimentales.	10
Figure 2 Schéma d'une parcelle représentant une unité expérimentale avec l'endroit de récolte de l'échantillon de sol. Les points en nuances de gris représentent les arbres et le point vert dans le cercle vert représente l'endroit précis où l'échantillon de sol a été prélevé.	11
Figure 3 Taux de survie des arbres, après quatre saisons de croissance, selon l'espèce et l'amendement en microorganismes symbiotiques. Les points représentent la moyenne du taux de survie (%) avec leur intervalle de confiance à 95%, les lettres représentent les comparaisons de moyennes pour ce même seuil significatif.	15
Figure 4 a) Abondance des taxons de bactéries regroupées au niveau du phylum selon les différentes combinaisons de traitements, b) Abondance des 10 genres les plus dominants. Les valeurs d'abondance pour chaque OTU sont empilées dans l'ordre du plus grand au plus petit, séparées par une fine ligne horizontale. La couleur des bandes représente le genre d'appartenance des OTUs. La lettre B représente l'amendement en biochar, la lettre S, l'amendement en microorganismes, la lettre A la plantation d'arbres, H, les herbacées et la lettre T représente les témoins. Les échantillons 'Control' proviennent de l'extérieur de la plantation.	19
Figure 5 Tracé des deux premières dimensions, sur quatre, de l'ordination de mise à l'échelle dimensionnelle non métrique (stress = 0,11) de la composition des communautés bactériennes. Le seuil significatif utilisé est de 0,15. Seulement les deux premières dimensions sont présentées sur un total de quatre avec un facteur de stress de 0,11, cela représente tout de même la majorité de la variation ($R^2 = 0,963$).	21
Figure 6 Représentation graphique de l'interaction entre l'inoculation et le biochar sur l'indice d'équitabilité de Pielou.	23
Figure 7 Arbre phylogénétique des champignons au niveau du phylum. Seulement les 100 taxons les plus abondants sont représentés. Les numéros représentent les 'bootstrap' et les points représentent un OTU, son abondance est montrée par la taille et son Phylum par la couleur. Le genre d'appartenance des OTUs est indiqué à la fin des branches.	24
Figure 8 Abondance taxonomique des champignons a) les 10 taxons les plus dominants et b) tous les champignons dominants groupés au niveau du genre en fonction des traitements. Les valeurs d'abondance pour chaque OTU sont empilées dans l'ordre du plus grand au plus petit, séparées par une fine ligne horizontale. La couleur des bandes représente le genre d'appartenance des OTUs. La lettre B représente l'amendement en biochar, S l'inoculation, H la plantation d'herbacées et A la plantation d'arbres. La lettre T représente les témoins, ou absence d'amendement.	25
Figure 9 Tracé de l'ordination de mise à l'échelle dimensionnelle non métrique (stress = 0,11) de la composition des communautés fongiques. Le seuil significatif utilisé est de 0,15. Seulement les deux premières dimensions sont montrées ($R^2 = 95,6$).	26
Figure 10 Représentation graphique de la courbe de raréfaction pour le calcul de diversité de Shannon.	43
Figure 11 Arbre phylogénétique des bactéries avec a) les 50 taxons dominants ou b) les taxons dominants (présents dans au moins 10% des échantillons)	44

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 Espèces végétales introduites sur le terrain en 2016.....</i>	<i>9</i>
<i>Tableau 2 Conditions des différents cycles de PCR pour les amplifications des séquences de bactéries (16S) et les amplifications des séquences des champignons (ITS).....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 3 Moyennes et écart-type des paramètres physico-chimiques des sols présentés par traitement</i>	<i>16</i>
<i>Tableau 4 Différents indices de diversité des communautés bactériennes, présentés par traitement</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 5 Les p-value résultants de l'ANOVA des paramètres de diversité pour les communautés bactériennes.</i>	<i>18</i>
<i>Tableau 6 Résultats de l'analyse canonique des corrélations (CCA) des effets des paramètres environnementaux sur les communautés bactériennes.</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 7 Différents indices de diversité des communautés fongiques, présentés par traitement.</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 8 Résultats de l'analyse multivariée des effets des paramètres environnementaux sur les communautés fongiques.</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 9 Descriptif des noms des traitements abrégés</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 10 Processus de nettoyage des séquences 16s avec QIIME2, nombre de séquences restantes après chaque étape de filtration par échantillon</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 11 Processus de nettoyage des séquences ITS avec QIIME2, nombre de séquences restantes après chaque étape de filtration par échantillon</i>	<i>46</i>

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ASV : *amplicon sequence variant*

CCA : *canonical correlation analysis*

CMA : champignon mycorhizien arbusculaires

ECM : ectomycorhize

ETM : élément-trace métallique

ITS : *internal transcribed spacer*

NMDS : *non-metric multidimensional scaling*

OTU : *operational taxonomic unit*

PCR : *polymerase chain reaction*

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur, M. Damase P. Khasa et ma codirectrice, Mme Chantal J. Beauchamp de m'avoir permis d'accomplir ce projet de maîtrise, de m'avoir soutenue et d'avoir cru en mes capacités à mener à terme cet ambitieux projet. Je remercie également Marie-Ève Beaulieu, ancienne professionnelle de recherche dans le laboratoire de M. Khasa à l'Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS) et actuellement chargée de projets à la direction des parcs du ministère de l'Environnement et de la lutte contre les changements climatiques du Québec, qui a été une ressource de premier plan pour la réalisation des différentes étapes de mon projet de maîtrise. Je souligne également l'aide apportée par mes collègues de l'équipe de Damase Khasa tout au long de ma maîtrise autant pour le soutien personnel que professionnel. J'aimerais aussi remercier Antoine Karam et son équipe pour leur accueil, leur patience et leur collaboration lors de la réalisation d'analyses physico-chimiques dans leur laboratoire du département des sols et de génie agroalimentaire de l'Université Laval.

Ce projet n'aurait pas pu être possible sans l'apport financier du programme Accélération de Mitacs et la participation financière des mines Bonterra Ressources Inc. et Eldorado Gold Inc. Une aide financière m'a de plus été accordée en dernière année, sous forme d'une bourse palliative COVID-19 du CEF (Centre d'étude de la forêt) qui m'a permis de continuer mes études malgré le contexte difficile de la pandémie.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont suivi dans mon projet d'étude et qui m'ont toujours soutenue et encouragée.

Introduction

La production de minéraux au Canada en 2018 s'élevait à 47 milliards de dollars, engendrant 626 000 emplois directs et indirects dans tout le pays, tant dans les régions urbaines que rurales et éloignées. Cela montre indéniablement l'importance économique et sociale de l'exploitation minière au Canada. Les industries minières produisent des résidus miniers qui contaminent les écosystèmes terrestres et aquatiques et provoquent leur dégradation à long terme.

Le gouvernement du Québec, qui est le 2^e producteur minier au Canada après l'Ontario, s'est doté d'un plan d'action 2017-2021 pour la protection et la réhabilitation des sols contaminés et il y a inclus des mesures pour favoriser les technologies vertes (MDDELCC, 2017). Depuis lors, les compagnies minières sont responsables de la restauration des sites dégradés par leurs activités. Selon le ministère de l'Énergie et des Ressources Naturelles du Québec (MERN), la restauration d'un site minier après l'exploitation vise à remettre le site dans un état satisfaisant et visuellement acceptable, sans risque pour la santé et la sécurité des personnes, sans risque pour l'environnement visant à rendre inutile le suivi à long terme (MERN, 2017).

Le retour à un écosystème diversifié, indigène et stable est un critère important de la restauration écologique (Brundrett, 2017). Or, l'établissement des végétaux sur des résidus miniers nécessite de l'aide et peut prendre plusieurs années (Bois et al., 2005), c'est pourquoi l'utilisation d'un inoculum qui accélérerait le processus est intéressante pour la restauration de l'écosystème. Plusieurs études sont réalisées pour étudier le potentiel de production d'inoculum mycorhizien afin de réhabiliter les sols dégradés par l'activité minière. Par exemple, Nadeau et al. (2018a) ont isolé des microorganismes indigènes qui pourraient faciliter la croissance et la santé de *Picea glauca* sur des résidus miniers aurifères. De ces analyses, deux espèces de champignons mycorhiziens (*Cadophora finlandia* et *Tricholoma sculpturatum*) et deux espèces de bactéries (*Azobacter chroococcum* et *Pseudomonas putida*) pourraient faciliter la végétalisation sur des résidus miniers aurifères en région nordique canadienne. D'autre part, l'utilisation des outils génomiques permet d'atteindre un meilleur degré de précision et de mieux comprendre l'impact de ce type d'activité minière sur la diversité fongique du sol (Tedersoo et al., 2016). Grâce aux outils technologiques en microbiologie et bio-informatique, certains chercheurs ont pu caractériser les communautés microbiennes dans différents substrats miniers (Azaiez et al., 2018; Ezeokoli et al., 2020; Tedersoo et al., 2016). Une méthode de plus en plus utilisée pour la phytoremédiation est la sélection des mycorhizes, sur le terrain à réhabiliter, qui servira à produire l'inoculum pour les plantations (Azaiez et al., 2018; Nadeau et al., 2018a). Or, plusieurs questions sont toujours irrésolues. L'originalité de cette recherche vient du suivi *in-situ* à moyen terme des végétaux et des communautés microbiennes d'un dispositif de plantation multi-spécifiques de végétaux avec des amendements en microorganismes symbiotiques et du biochar. De plus, l'utilisation d'un biochar local à l'échelle provinciale, des

microorganismes symbiotiques et des arbres indigènes au site d'étude et l'utilisation de technologie de biologie moléculaire pour la caractérisation des communautés microbiennes rendent cette recherche innovante. La région d'intérêt de ce mémoire se situe dans la sous-zone de la forêt boréale continue et dans le domaine bioclimatique de la pessière à mousse (MRN, 2003).

Ce mémoire sera ainsi présenté en plusieurs parties soit : (1) une première partie de revue de littérature où sera abordé le thème de la croissance végétale en contexte minier, incluant les impacts d'un amendement en biochar et de l'inoculation des microorganismes symbiotiques. Le deuxième grand thème abordé dans la revue de la littérature sera le microbiote du sol dans le contexte de restauration des sites miniers; (2) Les objectifs et hypothèses suivront la revue de littérature; (3) La méthodologie utilisée sera présentée ensuite, afin de répondre aux objectifs de la recherche qui inclut la description du site d'étude, l'échantillonnage, les analyses physico-chimiques du sol, les analyses moléculaires, les analyses bio-informatique et statistiques; (4) Les résultats obtenus seront présentés en commençant par les résultats concernant le premier sous-objectif soit la croissance végétale, puis ceux concernant le deuxième sous-objectif soit les communautés bactériennes, puis fongiques; (5) La discussion des résultats obtenus, la comparaison des résultats avec la littérature et les limites de l'étude permettront d'approfondir les résultats; (6) Finalement, une conclusion générale fera ressortir les points les plus importants de ce mémoire.

Revue de littérature

La restauration écologique

La définition gouvernementale de la restauration d'un site minier est de remettre le site minier dans un état satisfaisant (MERN, 2017). Or, cette définition est vague, car la satisfaction vis-à-vis d'un territoire, d'un paysage ou d'un écosystème est très subjective. Ce mémoire porte sur la restauration écologique d'un site minier, qui ajoute une précision à la norme du MERN. « La restauration écologique est une action intentionnelle qui initie ou accélère l'auto-réparation d'un écosystème qui a été dégradé, endommagé ou détruit (3-D), en respectant sa santé, son intégrité et sa gestion durable » (Clewell et al., 2004). D'autre part, Clewell et Aronson (2013) définissent la restauration écologique comme étant le processus d'aide à la restauration d'un écosystème qui a été dégradé, endommagé ou détruit. La restauration écologique peut utiliser une approche fine, se concentrant sur des espèces à réintroduire, ou une approche plus large visant à rétablir des conditions propices à la survie des espèces caractéristiques de l'écosystème désiré (Cristofoli et Mahy, 2010). La compréhension de ce mémoire doit se faire avec cette dernière approche où le processus de rétablissement des conditions biotiques et abiotiques d'un milieu va faciliter le retour à un écosystème fonctionnel et stable.

Ce concept de restauration écologique d'un milieu 3-D fait appel au concept de succession en écologie. La succession peut se rapporter aux végétaux, aux sols, tout comme aux microorganismes ou même à la faune. Suivant l'évolution du milieu, certaines espèces apparaîtront et d'autres disparaîtront. Ainsi, certains auteurs ont étudié les variations d'un écosystème selon son âge afin de définir certains stades de succession. Par exemple, l'évolution d'une forêt boréale commence par un état de forêt d'arbustes et de feuillus puis finit par la dominance des conifères en passant par un stade de codominance de feuillus-résineux (Ericson, 1980). Cette forêt est caractérisée par une dominance de résineux, des épinettes en particulier associées à d'autres essences arboricoles, dont quelques feuillus, des arbustes et peu d'herbacées. Les feuillus et les arbustes se retrouvent alors particulièrement lorsqu'il y a eu une trouée dans un peuplement de conifères, après une perturbation. Un autre exemple provient d'une étude faite en Alaska où il a été montré que les communautés microbiennes de fin de succession, dominées par les résineux, sont plus structurées, ont une dispersion plus faible, que les microbiomes associés aux espèces pionnières comme le saule et le peuplier (Knelman et al., 2018).

L'exploitation minière produit des quantités importantes de déchets qui sont épandus en halde de stériles (partie du minéral non utilisé) ou sur des bassins de rétention de résidus fins. Cela engendre des trouées dépourvues de vies sur le territoire et de la contamination possible des sols et des cours d'eau par l'érosion hydrique et éolienne. Pour éviter ce phénomène, il existe des solutions d'ingénierie de plusieurs types comme le traitement des eaux acides, l'isolement des résidus générateurs d'acide et l'inactivation biochimique des résidus (Blais, 1991). On peut voir, par exemple, l'utilisation de membranes synthétiques qui crée l'imperméabilité et empêche

l'oxydation des sulfures (Bousquet, 2000). D'autres types de recouvrement existent, par exemple une couche de sol, mais leur coût est prohibitif (Bousquet, 2000). Les contaminants peuvent aussi être simplement retirés du site puis traités chimiquement. Or, ces solutions demandent un suivi continu même sur les sites miniers qui ne sont plus en activité depuis plusieurs années. Ainsi, il est d'autant plus important de trouver des solutions passives, économiquement viables et durables. En effet, la restauration des sites miniers devrait être écologique et ne devrait pas seulement porter sur la décontamination des sols, mais aussi sur le retour à un écosystème viable et équilibré (Goltapeh et al., 2013).

La fertilité des sols

Lorsqu'on parle de restauration écologique des résidus miniers, le but premier est de végétaliser la zone perturbée en restaurant la fertilité du sol. Pour ce qui est des résidus fins issus de l'extraction chimique de l'or, ils sont généralement caractérisés par une quasi-absence de matière organique, un pH alcalin et une teneur élevée en aluminium, fer, soufre, magnésium, calcium et arsenic (Nadeau, 2015). Ces conditions sont défavorables à la majorité des végétaux, ce qui rend ardu le retour d'une régénération naturelle ou même artificielle de la forêt.

En effet, le sol n'est pas seulement un support physique, mais aussi le principal milieu nutritif pour les plantes qui peuvent y recueillir les aliments inorganiques, l'eau et les gaz nécessaires à leur croissance (Raven et al., 2007). La fertilité « est facilitée par : 1) le stockage des nutriments dans la matière organique du sol; 2) le recyclage des nutriments de la forme organique à une forme minérale disponible pour les végétaux; et 3) des mécanismes physiques et chimiques qui contrôlent l'absorption des nutriments, la disponibilité, le déplacement et les éventuelles pertes vers l'atmosphère et l'eau » (FAO, 2017). Les composés inorganiques, nutriments du sol, deviennent accessibles aux plantes par leur dissolution dans l'eau contenue dans les pores du sol sous forme de cations (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , etc.) et d'anions (NO_3^- , SO_4^{2-} , etc.). Ces ions peuvent ensuite être lessivés, absorbés ou précipités selon différents facteurs comme le pH, la présence d'argile, les microorganismes dans le sol, etc. (Raven et al., 2007). En effet, le pH est un des paramètres du sol qui a le plus d'influence sur la croissance des plantes et les communautés microbiennes. Le pH est un des facteurs majeurs des processus biogéochimiques du sol, en agissant sur la solubilité des métaux (Adriano, 2001). Par exemple, les plantes poussant dans des sols alcalins avec un pH au-dessus de 7 ont un risque accru de déficience en micronutriments comme le fer, le zinc, le magnésium, etc.

La matière organique du sol, qui contient des composés de carbone et d'autres minéraux (N, P, K, etc.) a aussi plusieurs fonctions pour la fertilité des sols en liant des nutriments, absorbant l'eau et en assurant une source de carbone aux microorganismes lors de leur biodégradation (Adriano, 2001). Le carbone organique est un acteur majeur dans les processus de mobilisation, d'absorption et d'anodisation des métaux. En effet, le cycle

du carbone dans le sol est un processus dynamique entre les plantes, le sol minéral et les microorganismes. La quantité de matière organique est un indice de la fertilité du sol, elle peut être mesurée de différente manière, dont la mesure du carbone total qui est un indice de la quantité de matière organique (FAO, 2017). L'azote est aussi un élément majeur et essentiel pour la fertilité du sol, car la carence en azote dans le sol est souvent le facteur limitant de la croissance des plantes (Raven et al., 2007). Sur un sol naturel, l'azote du sol provient des matières organiques en décomposition et de leur minéralisation par les microorganismes qui permettent l'assimilation des minéraux par les plantes sous forme d'ammonium ou de nitrate, selon le type de plante et ses associations microbiennes (Smith et Read, 2008). D'autre part, les communautés microbiennes sont affectées par les caractéristiques du sol comme le pH, le rapport C/N et la composition végétale (Merilä et al., 2010). Cette étude a de plus montré que la qualité de la matière organique aurait un effet sur les communautés microbiennes. Par exemple, ils ont démontré un lien entre la quantité et la qualité du carbone, l'azote du sol et les microorganismes saprotrophes et symbiotiques.

La phytoremédiation et les microorganismes

La phytoremédiation est une voie intéressante en restauration écologique. La phytoremédiation est l'utilisation des végétaux pour enlever, ou rendre inoffensifs, les contaminants ou les polluants de l'environnement (Nadeau et Khasa, 2016). Il y a plusieurs types de phytoremédiation, soit la phytoextraction, la phytodégradation, la rhizofiltration, la phytostabilisation et la phytovolatilisation. L'absorption des contaminants et des polluants par les végétaux peut se faire dans la biomasse racinaire ou aérienne selon la nature du composé chimique en question et de l'espèce végétale. Or, faire pousser des végétaux sur des sols contaminés demande des stratégies pour favoriser la croissance de ceux-ci. La phytoremédiation est une solution environnementale de réhabilitation des sols à la fois économique, acceptable par les communautés locales et ne demandant que peu d'entretien (Bissonnette et al., 2010; Pulford et Watson, 2003; Vodouhe et Khasa, 2015). Les autres avantages de cette technique sont le rétablissement du couvert végétal, la stabilisation des sols et la réduction de la dispersion des contaminants par l'érosion hydrique et éolienne tout en protégeant la structure et la communauté microbienne du sol (Bissonnette et al., 2010).

Il a d'ailleurs été reconnu que la plupart des réussites de phytoremédiation dépendent de l'association entre les microorganismes symbiotiques et la plante (Atangana et al., 2014; Beaudoin-Nadeau et al., 2016; Nadeau, 2015). Les champignons mycorhiziens peuvent contribuer à décontaminer le sol par leur effet direct sur les contaminants (rhizofiltration et phytodégradation), mais aussi par leur effet symbiotique sur la croissance des végétaux (phytoextraction et phytovolatilisation) (Goltapeh et al., 2013). En effet, les champignons mycorhiziens, par le développement du mycélium extraracinaire, permettent aux plantes d'avoir accès à plus d'éléments minéraux et d'eau. Les mycorhizes sécrètent des acides organiques qui augmentent le processus de minéralisation et mobilisent les nutriments majeurs (N, P, K), secondaires (Ca, Mg), traces (Mn, Zn, Cu, etc.) et

autres (Al, Fe), les rendant accessibles à la plante (Landeweert et al., 2001). Par exemple, la phytoextraction du cadmium par les peupliers est améliorée par l'association avec des ectomycorhizes (Bissonnette et al., 2010). L'inoculation des plants par des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) peut aussi favoriser une meilleure croissance initiale comme démontré par Bissonnette et al. (2010), et ce, malgré la présence des CMA qui colonisent naturellement ce milieu. Un consortium entre les bactéries et les champignons mycorhiziens permet une meilleure absorption des minéraux par les végétaux (phytoextraction), incluant une diminution de la toxicité des éléments-traces métalliques (ETM) (phytodégradation) (Ruiz-lozano et Azco, 2011). Bissonnette et al. (2010) ont observé une réduction de la concentration de métaux lourds dans la biomasse du saule et du peuplier lorsqu'inoculés avec le CMA *Rhizophagus irregularis* (anciennement *Glomus intraradices*). La plupart des champignons et quelques bactéries, qui peuvent survivre et croître dans des conditions toxiques, ont aussi la capacité de dégrader des éléments toxiques en composés neutres (phytodégradation) (Goltapeh et al., 2013). En effet, il a été démontré que les microorganismes du sol et les plantes interagissent et affectent les métaux du sol en utilisant diverses approches, telles que la modification des exsudats racinaires, la production d'acides organiques, la précipitation d'éléments chimiques dans le sol et l'immobilisation des métaux lourds avec des ligands, dont les sidérophores (Adriano, 2001; Khalid et al., 2021). Les mycorhizes aident aussi à augmenter la stabilité du sol grâce à la production de la glomaline, une glycoprotéine qui favorise l'agrégation du sol autour des racines fines (phytostabilisation) (González-Chávez et al., 2009). Ils peuvent immobiliser les composés toxiques dans leur tissu fongique ou bien dans la rhizosphère, ce qui les rend inaccessibles à la plante, réduisant l'effet nocif (phytostabilisation) (Sánchez-Castro et al., 2017).

Une analyse de la littérature faite par Gamalero et al. (2009) a noté que les effets des champignons mycorhiziens dans l'accumulation des composés toxiques dans les plantes ne sont pas toujours les mêmes. Ils peuvent en effet soit favoriser l'accumulation des minéraux à des concentrations toxiques dans les tissus végétaux spécialisés ou non, ce qui peut parfois réduire leur croissance, soit diminuer l'absorption des minéraux pour protéger la plante de la toxicité ou bien ne produire aucun changement. L'effet des mycorhizes sur l'absorption des minéraux par les plantes est donc complexe et varie selon le type d'interaction, les espèces concernées ainsi que les minéraux en présence. Sánchez-Castro et al. (2017) ont de plus noté l'importance d'utiliser les microorganismes symbiotiques dans la phytoremédiation, plus particulièrement lorsque le sol est contaminé par les ETM depuis plusieurs années. De plus, les fortes concentrations de métaux lourds peuvent aussi affecter la croissance et la sporulation des CMA. Ainsi, l'utilisation des espèces indigènes, qui sont déjà adaptées aux conditions édaphiques, est à privilégier dans la phytoremédiation (Göhre et Paszkowski, 2006; Nadeau et al., 2018a, 2018b). Ainsi, en inoculant des plantes par des mycorhizes indigènes du milieu à réhabiliter, la communauté de microorganismes s'implantera plus rapidement afin de faire des symbioses et de profiter aux végétaux plus rapidement. En effet, les souches de mycorhizes exotiques peuvent être adaptées pour certains types de toxines, ou différentes conditions édaphiques, qui ne sont pas présents sur le terrain.

Le biochar

L'utilisation du biochar pour la restauration des sites contaminés est de plus en plus étudiée. Le biochar est un résidu de la pyrolyse de matière organique en absence d'oxygène. C'est un produit qui peut parfois être utilisé en agriculture, en horticulture ou en foresterie pour améliorer la fertilité du sol, la rétention en eau et l'activité microbienne, de manière à améliorer la croissance des végétaux (Allaire et al., 2015). Un autre avantage qui rend cette matière intéressante pour la restauration des sites contaminés est la capacité du biochar d'améliorer la capacité d'échange cationique du sol (Luo et al., 2018). Or, il faut toutefois prendre en considération plusieurs caractéristiques du biochar avant de l'utiliser sur un site particulier, car sa composition, la température de pyrolyse, sa porosité et la densité d'application pourront faire largement varier ses propriétés pour la fertilité du sol. En effet, Allaire et al. (2015) ont démontré, par exemple, que le pH de différents biochar provenant de bois pouvait varier de très acide à très alcalin (pH 4,0 – 10).

Le biochar peut modifier les propriétés des sols en améliorant la rétention de l'eau, en diminuant la disponibilité des contaminants, en ajoutant du charbon au sol et en modifiant les activités microbiennes (Zhang et al., 2018). De plus, le biochar contient plusieurs micro- et macro- nutriments qui peuvent être relâchés dans le sol dont le carbone, le potassium et l'azote, et certains pourront être rendus accessibles aux plantes si les conditions le permettent. Dans l'article de Zhang et al. (2018), la croissance végétale et la biomasse fongique ont été augmentées avec l'ajout du biochar d'eau usée d'un système de phytoremédiation. La plupart des travaux de recherche trouvés dans la littérature portent sur des biochars issus de matériaux non-ligneux. Or, au Canada, la quantité de déchets ligneux issus de la foresterie est grande et leur utilisation pour l'amélioration de la fertilité des sols pourrait être avantageuse au niveau environnemental et économique (Homagain et al., 2014). D'autre part, selon Kelly et al. (2014), le biochar peut être une stratégie efficace pour la restauration des sites miniers si le taux d'application est assez haut, à 30% v/v dans la présente étude, pour avoir une capacité d'absorption des métaux lourds suffisante et pour pouvoir améliorer le pH du sol vers la neutralité ou une minime acidité.

Chapitre 1 Évaluation de la végétalisation et des communautés microbiennes d'un système agroforestier quatre ans après l'implantation sur les rejets miniers aurifères en région nordique canadienne

Ce mémoire s'inscrit dans le domaine de la restauration écologique des rejets miniers en région nordique canadienne, plus précisément au nord du Québec. C'est une poursuite des travaux de recherche de doctorat de Asmara (2020) qui a étudié des amendements en biochar et en microorganismes symbiotiques avec différents mélanges d'espèces ligneuses et herbacées pour mieux identifier les facteurs influençant la restauration des résidus miniers et les stériles à pH alcalin pendant trois ans. Les conclusions générales de ses travaux ont montré un effet négatif du biochar seul, mais un effet combiné du biochar et de l'inoculation avec des microorganismes symbiotiques qui était positif. Ainsi, l'activité microbienne semblait être favorisée par l'amendement en biochar, sans que cela ait pu être confirmé dans les analyses faites par (Asmara, 2020).

Objectifs et hypothèses

L'objectif général de ce mémoire est d'évaluer le potentiel de différents systèmes d'implantation pour la végétalisation d'un terrain dégradé par l'exploitation minière quatre ans après l'implantation. Les objectifs spécifiques sont : (1) d'évaluer, *in situ*, la survie des végétaux dans les résidus miniers; (2) d'explorer la diversité des communautés microbiennes en fonction des paramètres physico-chimiques du sol et d'observer la présence de microorganismes symbiotiques dans les résidus miniers. Les hypothèses de cette recherche sont : (1) Le taux de survie des végétaux varie en fonction de la composition et de la structure végétale, de l'amendement en biochar et de l'inoculation des végétaux avec des microorganismes symbiotiques; (2) La diversité microbienne varie en fonction de l'amendement en biochar, de l'inoculation des végétaux avec des microorganismes symbiotiques, de la composition, de la structure végétale du système de végétalisation et des paramètres physico-chimiques du sol.

Matériel et méthodes

Site d'étude et dispositif expérimental

L'étude présentée dans ce mémoire s'est concentrée sur un des sites étudiés par Asmara (2020), soit la mine d'or Ressources Bonterra inc. située à Desmaraisville près de la limite sud de la région administrative du Nord-du-Québec, Canada (N 49°29'40.1" et W 076°08'49.9"). La température moyenne de la région varie de -24 °C à 18 °C avec des précipitations autour de 1 000 mm par année, incluant 332 cm de neige (Environment Canada, 2017).

Le dispositif expérimental était un plan en tiroirs avec des sous-sous parcelles (*split-split plot*) de 4 blocs avec une combinaison de 3 traitements (amendement en biochar, inoculation microbienne et mélange d'espèces végétales) répartis sur chacun des blocs pour un total de 48 unités expérimentales (Figure 1). Chaque unité expérimentale mesurait 48 m². En parcelle principale, le traitement de biochar représente l'application ou non d'un amendement en biochar à un taux de 20 tonnes/ha appliqué juste avant la plantation. Ce biochar, produit par la compagnie Award Rubber Inc., provient de résidus d'écorces d'érable pyrolysés à 700 °C pendant 20 min (Allaire et al., 2015; Asmara, 2020). En sous-parcelle est l'application ou non d'un inoculum microbien aux semis des arbres et au moment de la plantation pour les herbacés. Celui-ci contenait un mélange d'ectomycorhizes (ECM, *Cadophora finlandia* et *Tricholoma scalpturatum*), de champignon mycorhizien arbusculaires (CMA, *Rhizophagus irregularis*) et de bactéries (Bact, *Azobacter chroococcum*, *Pseudomonas putida* et *Frankia alni*). En sous-sous-parcelles se trouve la structure végétale qui contient trois niveaux (arbres, herbacées ou arbres et herbacées) (Tableau 1). Les arbres, au nombre de 48 lorsque présents, avaient la même disposition d'une parcelle à l'autre.

Tableau 1 Espèces végétales introduites sur le terrain en 2016

Arbres	Herbacées
Aulnes (<i>Alnus viridis</i> ssp. <i>Crispa</i>),	Trèfle blanc (<i>Trifolium repens</i>)
Saules arbustifs (<i>Salix arbusculoïdes</i>),	Avoine (<i>Avena sativa</i>)
Épinettes blanches (<i>Picea glauca</i>)	Fétuque rouge (<i>Festuca rubra</i>)
Peupliers faux-trembles (<i>Populus tremuloïdes</i>)	

	Sans biochar			Avec biochar		
Sans inoculation	Herbacées	Arbres	Arbres et herbacées	Arbres	Herbacées	Arbres et herbacées
Avec inoculation	Arbres	Arbres et herbacées	Herbacées	Arbres et herbacées	Arbres	Herbacées

Figure 1 Schéma présentant le bloc 1 contenant 12 unités expérimentales.

Échantillonnage

L'inventaire des végétaux et l'échantillonnage du sol ont été menés une fois en septembre 2019. Les herbacées sur le site d'étude ont très peu survécu et donc leur biomasse n'a pu être déterminée. Une échelle ordinale de recouvrement du sol a donc été créée pour observer la présence ou l'absence d'herbacées dans la parcelle. L'échelle est basée sur un gradient de 0 à 4 où 0 indique l'absence d'herbacées et 4 la présence d'herbacées dans tous les quadrants de la parcelle. Des 1536 arbres plantés en 2016, 1123 arbres ont été comptés en 2019 pour calculer le taux de survie des arbres sur le site d'étude et par espèce.

Des échantillons de sol ont été prélevés pour les analyses physico-chimiques et moléculaires subséquentes. Pour chacune des 48 parcelles, environ 50 ml de sol à une profondeur approximative de 10 cm ont été récoltés à un endroit spécifique de la parcelle qui représente l'unité expérimentale (Figure 2). Cet endroit a été défini afin d'être à équidistance de chaque espèce d'arbres dans un rayon le plus faible entourant les quatre espèces d'arbres de façon à obtenir le microbiome représentatif du sol et non de la rhizosphère d'une espèce d'arbre en particulier. D'ailleurs, afin d'éviter la contamination entre les échantillons, la couche organique du sol a été enlevée, exposant le sol minéral, avant de prendre les échantillons puis les outils utilisés ont été décontaminés avec de l'hypochlorite de sodium à 10 % entre chaque échantillon. Des échantillons de sol qui se situaient à l'extérieur du dispositif de plantation, mais dans le même milieu, ont été pris afin de suivre l'évolution naturelle des résidus miniers non traités.

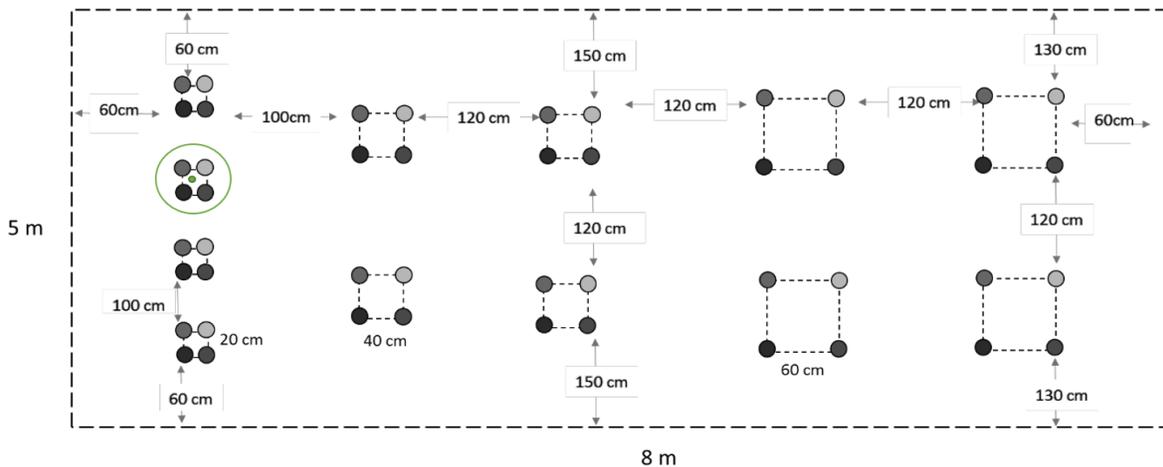


Figure 2 Schéma d'une parcelle représentant une unité expérimentale avec l'endroit de récolte de l'échantillon de sol. Les points en nuances de gris représentent les arbres et le point vert dans le cercle vert représente l'endroit précis où l'échantillon de sol a été prélevé.

Analyses physico-chimiques du sol

Le sol a été pesé et séché à 50°C pendant 4 jours. Un sous-échantillon de 10 g a été prélevé pour les mesures de pH et de salinité. Le pH à l'eau a été mesuré dans une solution 1:2 (v/v) d'eau distillée avec un pH-mètre (CEAEQ, 2014). La salinité a été mesurée dans le surnageant de la solution utilisée pour la mesure du pH, après un repos de 30 minutes (CEAEQ, 2015). Un autre sous-échantillon de 10 g a ensuite été prélevé pour envoyer au laboratoire de chimie de la Faculté de foresterie, de géographie et de géomatique de l'Université Laval pour quantifier le carbone et l'azote total. Les concentrations en carbone et azote total du sol ont été analysées par combustion sèche sur un analyseur élémentaire modèle Trumac CNS (LECO corporation, 2019).

Analyse moléculaire des communautés microbiennes

Le kit PowerSoil de Mo Bio a été utilisé pour extraire l'ADN de 500 mg de sol qui avait été préalablement broyé au mortier (Mo Bio Laboratories, 2013). Le protocole prescrit par le fabricant et l'élution finale a été fait dans 50 µl d'eau ultrapure. Ensuite, un gel d'électrophorèse à 1% (g/v) a été préparé et 1,2 µl d'ADN a été quantifié à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop 1000 (BioRad, 2012), la concentration de chaque échantillon d'ADN a ensuite été normalisée à 20 µg/µl.

Pour la préparation des bibliothèques, nous avons utilisé une approche d'amplification double-index à deux étapes, spécifiquement créée pour les instruments Illumina, décrite par Klindworth et al. (2013) pour les bactéries et par Tedersoo et al. (2015) pour les champignons. Les amorces utilisées pour amplifier la région V3-V4 du gène 16s des bactéries sont les suivantes :

341F : ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTACGGGNGGCWGCAG)
805R : GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTGACTACHVGGGTATCTAATC.

Les amorces utilisées pour cibler le gène ITS des champignons, qui ont été multiplexées, sont les suivantes :

ITS1Fngs: ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS2: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3tagmix1: CACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCAG
ITS3tagmix2: ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTAGACTCGTCAACGATGAAGAACGCAG
ITS3tagmix3: ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTAGACTCGTACCGATGAAGAACGCAG
ITS3tagmix4: ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGTAG
ITS3tagmix5: ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGTGG
ITS4ngs: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTTCTSCGCTTATTGATATGC

Pour les bactéries comme pour les champignons, les amorces génériques suivantes ont été utilisées pour ajouter les barcodes aux séquences lors de la deuxième étape de PCR :

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[index1]ACACTCTTCCCTACACGAC
CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[index2]GTGACTGGAGTTCAGACGTGT¹

Le protocole d'amplification a suivi les recommandations du fabricant pour la Taq polymérase Q5 (New England Biolabs, 2020). Les amplifications ont été faites dans une solution de 50 µl et la composition était la suivante : 40 µg d'ADN, 0,2 µM de dNTPs, 0,5 µM d'amorces, 1X de solution tampon et amplificateur fournis par New England Biolab et 0,02 µM de Taq polymérase Q5. Les conditions d'amplification ont été faites dans un thermocycleur et sont présentées au Tableau 2. Les amplicons ont ensuite été observés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% et colorés au bromure d'éthidium pour être photographiés. Les échantillons n'ayant pas donné de bande ou contaminés ont été refaits. Les amplicons ont ensuite été purifiés en utilisant la plaque magnétique de Axygen Biosciences (2013) avec des billes magnétiques d'un ratio de 0,7 pour les bactéries et 0,9 pour les champignons, dans l'eau ultrapure et de l'éthanol à 80%. Les amplicons purifiés ont été quantifiés avec le Nanodrop et leur concentration normalisée à 20 µg/µl pour la 2^e PCR. Les étapes de purification et de quantification ont été refaites après la 2^e PCR. Les amplicons bactériens et fongiques ont été regroupés séparément à une concentration équimolaire, puis envoyés à la Plateforme d'analyses génomiques (IBIS, Université Laval, Québec) pour la création des deux bibliothèques avec Illumina Miseq.

¹ Veuillez noter que les amorces utilisées dans cette recherche contiennent des séquences spécifiques d'Illumina protégé pour la propriété intellectuelle. (Oligonucleotide sequences © 2007-2013 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Les travaux dérivés créés par les clients d'Illumina sont autorisés à être utilisés uniquement avec les instruments et produits Illumina. Toutes les autres utilisations sont strictement interdites.)

Tableau 2 Conditions des différents cycles de PCR pour les amplifications des séquences de bactéries (16S) et les amplifications des séquences des champignons (ITS)

16S		ITS	
1 ^{ère} PCR	2 ^e PCR	1 ^{ère} PCR	2 ^e PCR
1. 98°C pour 2 min.			
2. 35 cycles: 98°C pour 10 sec. 55°C pour 30 sec. 72°C pour 30 sec.	2. 15 cycles: 98°C pour 10 sec. 55°C pour 30 sec. 72°C pour 30 sec.	2. 15 cycles: 98°C pour 10 sec. 53°C pour 30 sec. 72°C pour 30 sec.	2. 15 cycles : 98°C pour 10 sec. 65°C pour 30 sec. 72°C pour 30 sec.
3. 72°C pour 2 min.	3. 72°C pour 2 min.	3. 15 cycles: 98°C pour 10 sec. 65°C pour 30 sec. 72°C pour 30 sec.	3. 72°C pour 2 min.
		4. 72°C pour 2 min.	

Analyses bio-informatique

Le traitement des séquences moléculaires a été fait avec QIIME 2 2018.8, 2019.10.0, 2020.2.0 (Bolyen et al., 2019; Caporaso et al., 2010). Les séquences ont d'abord été filtrées et nettoyées avec la commande *denoise-paired* du plug-in DADA2 selon leur qualité ($Q > 25$) (Callahan et al., 2016; McDonald et al., 2012). Pour les bactéries, les séquences *forward* ont été coupées à 280 pb et celles *reverse* à 240 pb. Les séquences des champignons ne permettaient pas un alignement et seulement les séquences *forward*, coupées à 280 pb, ont donc été utilisées. Les séquences ont ensuite été alignées en utilisant la commande *mask* de la méthode MAFFT (Katoh et Standley, 2013; Ludwig, 2007), puis l'alignement a été filtré pour éliminer les régions qui étaient très variable, considérées comme de la distorsion pour la phylogénie. L'arbre phylogénétique enraciné a été créé avec les commandes *phylogeny fasttree* et *mid-point* (Price et al., 2010). Les paramètres de biodiversité ont aussi été calculés sur QIIME2 avec la commande *diversity core-metrics-phylogenetic*, incluant la normalisation, la raréfaction des données et l'ordination (McKinney, 2010; Weiss et al., 2017). Ainsi, l'indice de diversité alpha Shannon a été calculé, la richesse spécifique, l'équitabilité et la diversité phylogénétique de Faith (Faith, 1992). L'indice de diversité basée sur la présence ou absence d'un ASV (*Amplicon Sequence Variants*) (Callahan et al., 2017), *Unifrac* a été calculé (Lozupone et Knight, 2005; Lozupone et al., 2007) ainsi que l'indice de distance Bray-Curtis (Beals, 1984). Finalement, afin d'assigner une taxonomie aux ASVs obtenus, un système de classification a été entraîné avec la commande *fit-classifier-naive-bayes* (Bokulich et al., 2018) en fonction de la base de données de Silva 138-99 (Pruesse et al., 2007; Quast et al., 2013) pour les bactéries et la base de données UNITE-ver7-99 a été utilisée pour les champignons (Abarenkov et al., 2020). La taxonomie de chaque ASV a ensuite été assignée avec *classify-sklearn*, identifiant ainsi des *operational taxonomic unit* (OTUs) selon un taux de 99 % (Pedregosa et al., 2011; Rognes et al., 2016). Les OTUs ont été ensuite filtrés et nettoyés selon

la méthode de (Callahan et al., 2017), c'est-à-dire que les séquences qui se retrouvaient moins de 3 fois et dans moins de 20 % des échantillons ont été éliminées antérieurement au calcul des indices de diversité.

Analyses statistiques

L'analyse de la variabilité des moyennes du taux de survie des arbres a été effectuée selon un modèle linéaire mixte avec une régression binomiale (arbre mort, arbre vivant) sur le logiciel statistique R (Pinheiro et al., 2020; R Core Team, 2020). Le plan en tiroirs (*split-split plot*) a été pris en compte dans le modèle avec les effets aléatoires du bloc, de la sous-parcelle et du quadrat où l'arbre se trouve avec les *packages* 'nlme' et 'lme4' (Bates et al., 2020; Pinheiro et al., 2020). Les comparaisons de moyennes (TukeyHSD) ont ensuite été faites en utilisant les *packages* 'emmeans' et 'multcomp' (Hothorn et al., 2020; Lenth et al., 2020). Les analyses statistiques faites avec les données moléculaires ont été produites avec les *packages* 'phyloseq' et 'vegan' pour les graphiques d'abondance et les analyses multivariées (positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) et analyse canonique des corrélations (CCA)) (Mcmurdie et al., 2021; Oksanen, 2020). Les indices de diversité alpha ont d'abord été calculés dans QIIME2 puis importés sur R avec le package 'QIIME2R' (Bisanz, 2018). Les comparaisons entre groupes d'échantillons, pour la diversité beta, ont été faites avec des analyses de variance (ANOVA), et des comparaisons multiples de TukeyHSD. Pour tous les tests statistiques effectués, la normalité des résidus, l'hétérogénéité des variances et la normalité des effets aléatoires ont été vérifiés graphiquement.

Résultats

Analyses de croissance végétale

De façon générale, les arbres dans notre dispositif expérimental sur les résidus miniers ont bien survécu après quatre saisons de croissance sur le terrain avec une moyenne générale du taux de survie de $75,2 \pm 5,86$ %. L'analyse de variance du taux de survie des arbres n'a pas montré d'effets significatifs des traitements biochar, inoculation et mélange végétal (p -value respectivement 0,53; 0,07; 0,5). Or, il y a des différences entre les espèces d'arbres dont une interaction entre l'espèce d'arbre et l'inoculation (p -value $< 0,001$). La Figure 3 montre les taux de survie des arbres après quatre ans sur le terrain selon l'application des amendements en biochar, l'inoculation de microorganismes symbiotiques et l'espèce d'arbre. L'interaction entre les espèces et l'inoculation en microorganismes est statistiquement significative (p -value 2×10^{-11}). Les taux de survie des arbres sont élevés, particulièrement pour l'aulne, l'épinette et le saule. Pour l'aulne (*A. viridis* ssp. *Crispa*), le taux de survie augmente d'une moyenne de $52,0 \pm 10,6$ % à une moyenne de $91,8 \pm 3,5$ % avec un amendement en microorganismes. Les moyennes du taux de survie des épinettes, des saules et des peupliers ne présentent pas de différences significatives pour l'inoculation.

Taux de survie de l'arbre selon son espèce et l'amendement en microorganismes

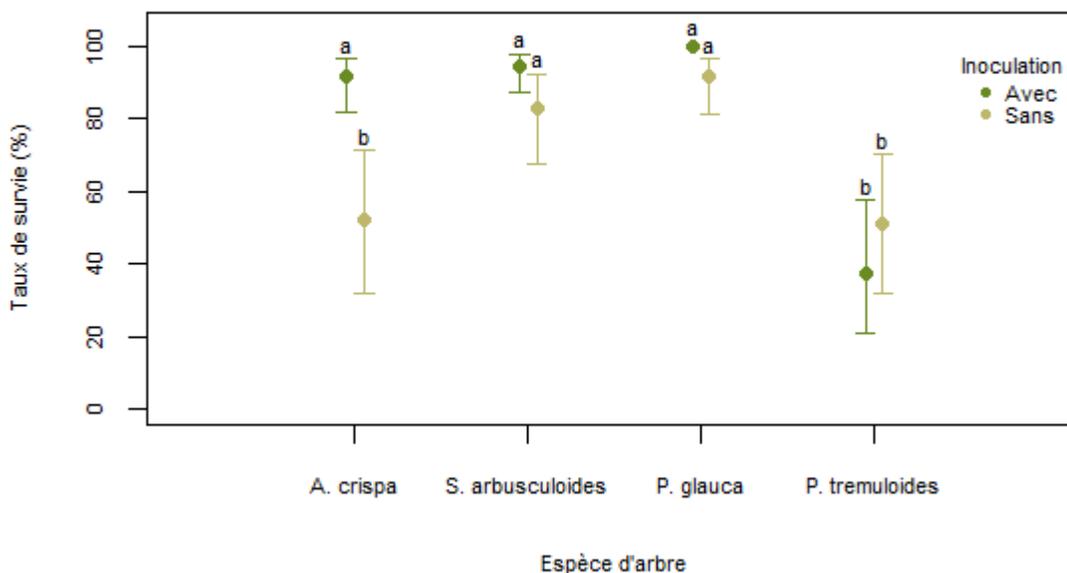


Figure 3 Taux de survie des arbres, après quatre saisons de croissance, selon l'espèce et l'amendement en microorganismes symbiotiques. Les points représentent la moyenne du taux de survie (%) avec leur intervalle de confiance à 95%, les lettres représentent les comparaisons de moyennes pour ce même seuil significatif.

Analyses physico-chimiques des sols

Les analyses physico-chimiques des sols ont montré de faibles effets des traitements sur les caractéristiques des sols dans cette expérience. L'amendement en biochar a eu un effet positif sur les concentrations en carbone et azote total et du ratio C/N (p -value <0,0001). L'inoculation et le mélange végétal n'ont pas affecté les paramètres mesurés avec des p -value > 0,2. Les moyennes des paramètres analysés avec leur écart-type, groupées selon leur combinaison des traitements (biochar, inoculation et mélange végétal), sont présentées au Tableau 3 montrant des concentrations en azote et en carbone très faibles et qu'un rapport C/N élevé pour tous les traitements. Pour ces trois paramètres, l'effet du biochar est similaire. Comparativement aux échantillons hors de la plantation, le carbone et l'azote total, ainsi que leur rapport, sont deux fois plus élevés lorsqu'il y a eu un amendement en biochar.

Tableau 3 Moyennes et écart-type des paramètres physico-chimiques des sols présentés par traitement

Traitements	pH*	EC (μ s/cm)*	Teneur en eau (%)*	Azote (%)	Carbone (%)	C/N
BSA	8,33 \pm 0,05	405,8 \pm 160,2	19,3 \pm 10,0	0,019 ^{ab} \pm 0,002	1,51 ^{abc} \pm 0,40	79,6 ^{abcd} \pm 15,0
BSH	8,25 \pm 0,06	361,3 \pm 65,4	22,5 \pm 10,5	0,031 ^{ab} \pm 0,011	2,90 ^{ab} \pm 1,40	90,2 ^{ab} \pm 16,5
BSHA	8,28 \pm 0,10	300,9 \pm 76,4	16,3 \pm 2,2	0,023 ^{ab} \pm 0,002	1,81 ^{abc} \pm 0,28	77,1 ^{abcd} \pm 6,5
BTA	8,30 \pm 0,08	405,3 \pm 134,7	15,8 \pm 1,5	0,025 ^{ab} \pm 0,016	1,99 ^{abc} \pm 1,26	79,3 ^{abcd} \pm 14,6
BTH	8,28 \pm 0,15	297,3 \pm 147,8	15,3 \pm 2,1	0,042 ^a \pm 0,020	4,27 ^a \pm 2,55	93,9 ^a \pm 21,1
BTHA	8,25 \pm 0,10	304,5 \pm 82,9	15,8 \pm 1,0	0,031 ^{ab} \pm 0,015	2,77 ^{ab} \pm 1,24	89,5 ^{abc} \pm 6,7
TSA	8,38 \pm 0,10	350,8 \pm 156,5	13,5 \pm 1,9	0,014 ^b \pm 0,001	0,95 ^c \pm 0,05	67,2 ^{abcd} \pm 2,3
TSH	8,40 \pm 0,12	287,0 \pm 49,8	14,0 \pm 2,0	0,015 ^b \pm 0,001	0,93 ^c \pm 0,05	62,6 ^{cd} \pm 5,1
TSHA	8,28 \pm 0,05	296,0 \pm 52,9	15,0 \pm 0,8	0,018 ^{ab} \pm 0,005	1,09 ^{bc} \pm 0,20	61,2 ^d \pm 7,8
TTA	8,33 \pm 0,10	434,3 \pm 108,4	14,8 \pm 1,7	0,015 ^b \pm 0,001	0,96 ^c \pm 0,07	63,6 ^{abc} \pm 1,7
TTH	8,38 \pm 0,13	278,5 \pm 122,0	14,5 \pm 3,1	0,015 ^b \pm 0,002	0,93 ^c \pm 0,02	64,7 ^{bcd} \pm 6,6
TTHA	8,23 \pm 0,05	409,3 \pm 96,5	15,5 \pm 1,3	0,018 ^b \pm 0,010	1,22 ^{bc} \pm 0,50	70,2 ^{abcd} \pm 6,3
Hors de la plantation	8,40 \pm 0,10	233,0 \pm 47,5	17,3 \pm 0,6	0,017 ^{ab} \pm 0,002	0,97 ^{abc} \pm 0,10	59,1 ^{abcd} \pm 9,1

NB Les moyennes sont présentées par groupe de traitement où le B représente le biochar, le S l'inoculation, le H les herbacées, le A les arbres et le T les témoins (Tableau 9, annexe). Les moyennes sont présentées avec leur déviation standard. Une lettre différente adjacente à la moyenne dans une même colonne montre une différence significative selon le test de Tukey (p -value < 0,05). *Aucune lettre n'est présentée puisque la p -value > 0,05.

Analyses des communautés bactériennes

Il y a eu 3 457 690 séquences brutes réparties dans les 52 librairies à la suite du séquençage. Au total, six échantillons ont dû être enlevés des analyses moléculaires après filtration lors des analyses bio-informatiques dues à leur mauvaise qualité. Après nettoyage et filtration des séquences, 20 % des séquences initiales (271 926) ont été utilisées pour les analyses subséquentes regroupées dans 407 différents OTUs. Le Tableau 4 présente les indices de diversité calculés à partir de ces séquences en regroupant des communautés bactériennes provenant du sol des mêmes combinaisons de traitements.

Tableau 4 Différents indices de diversité des communautés bactériennes, présentés par traitement

Traitements (n)	Nb de séquences initial	Nb de séquences finales	Richesse spécifique (OTUs)*	Indice de diversité de Shannon*	Indice de dominance de Pielou	Diversité phylogénétique de Faith*
BSA (3)	289 258	32 740	300 ± 139	7,51 ± 0,9	0,92 ^a ± 0,05	31,27 ± 19,81
BSHA (1)	66 322	4 046	167	6,36	0,86 ^a	21,78
BSH (4)	304 478	23 172	271 ± 43	7,40 ± 0,4	0,92 ^a ± 0,02	35,25 ± 5,82
TSA (4)	227 669	16 115	178 ± 57	6,68 ± 0,55	0,90 ^{ab} ± 0,02	20,39 ± 3,93
TSHA (4)	183 823	15 503	355 ± 173	7,87 ± 0,78	0,94 ^a ± 0,02	48,43 ± 20,77
TSH (4)	182 430	12 472	227 ± 83	6,81 ± 0,81	0,88 ^b ± 0,07	25,02 ± 10,22
BTA (3)	191 604	9 920	221 ± 56	6,96 ± 0,49	0,90 ^a ± 0,02	28,75 ± 9,13
BTSHA (3)	698 235	60 377	227 ± 140	6,92 ± 1,2	0,91 ^a ± 0,03	31,11 ± 15,55
BTH (3)	269 443	24 033	213 ± 89	6,79 ± 0,83	0,89 ^a ± 0,04	32,73 ± 14,53
TTA (4)	250 991	16 798	196 ± 132	6,64 ± 1,16	0,90 ^a ± 0,04	22,69 ± 11,23
TTHA (4)	222 036	12 458	212 ± 56	6,84 ± 0,52	0,89 ^a ± 0,02	25,18 ± 8,8
TTH (4)	311 443	17 902	221 ± 65	7,05 ± 0,5	0,91 ^a ± 0,02	27,38 ± 9,47
Hors de la plantation (4)	259 958	26 390	282 ± 130	7,28 ± 1,13	0,91 ^a ± 0,04	39,70 ± 21,14
Total	3 457 690	271 926				

NB La lettre B représente l'amendement en biochar, S l'inoculation, H la plantation d'herbacées et A la plantation d'arbres. La lettre T représente l'absence d'amendement, c.-à-d. un traitement témoin. La richesse spécifique contient seulement les taxons qui sont présents dans au moins 10 % des échantillons contrairement au nombre d'OTUs (*operational taxonomic unit*) qui est un total. Une lettre différente adjacente à la moyenne dans une même colonne montre une différence significative selon le test de Tukey (p -value < 0,05). *Aucune lettre n'est présentée puisque la p -value > 0,05.

On peut voir dans le Tableau 4 que le groupe BSHA ne contient plus qu'un seul échantillon, cela est dû à la mauvaise qualité des séquences que contenaient les échantillons de ce groupe. Ils ont donc dû être éliminés. Les résultats obtenus des comparaisons avec ce groupe doivent donc être analysés avec prudence puisqu'aucune répétition n'est présente pour ce traitement. D'autre part, les analyses de variances obtenues ne montrent aucun effet significatif des traitements (p -value < 0,05) pour tous les paramètres calculés (Tableau 5). Or, une interaction entre les trois facteurs a pu être observée pour l'indice de dominance de Pielou. D'autre part, l'arbre phylogénétique découlant des séquences obtenues est présenté en annexe seulement, car la forte diversité rend la représentation graphique illisible (Figure 11).

Tableau 5 Les p -value résultants de l'ANOVA des paramètres de diversité pour les communautés bactériennes.

	Richesse spécifique (OTUs)	Indice de diversité de Shannon	Indice de dominance de Pielou	Diversité phylogénétique de Faith
Biochar (Bioc)	0,8274	0,7572	0,8297	0,4020
Inoculation (Ino)	0,1133	0,0998	0,2081	0,2228
Mélange de végétaux (Mixt)	0,4355	0,4699	0,5239	0,1368
Bioc*Ino	0,7697	0,5700	0,6369	0,6494
Bioc*Mixt	0,2422	0,2288	0,8085	0,1142
Ino*Mixt	0,6316	0,6305	0,4460	0,2142
Bioc*Ino*Mixt	0,1820	0,1315	0,0359*	0,1409

* p -value < 0,05

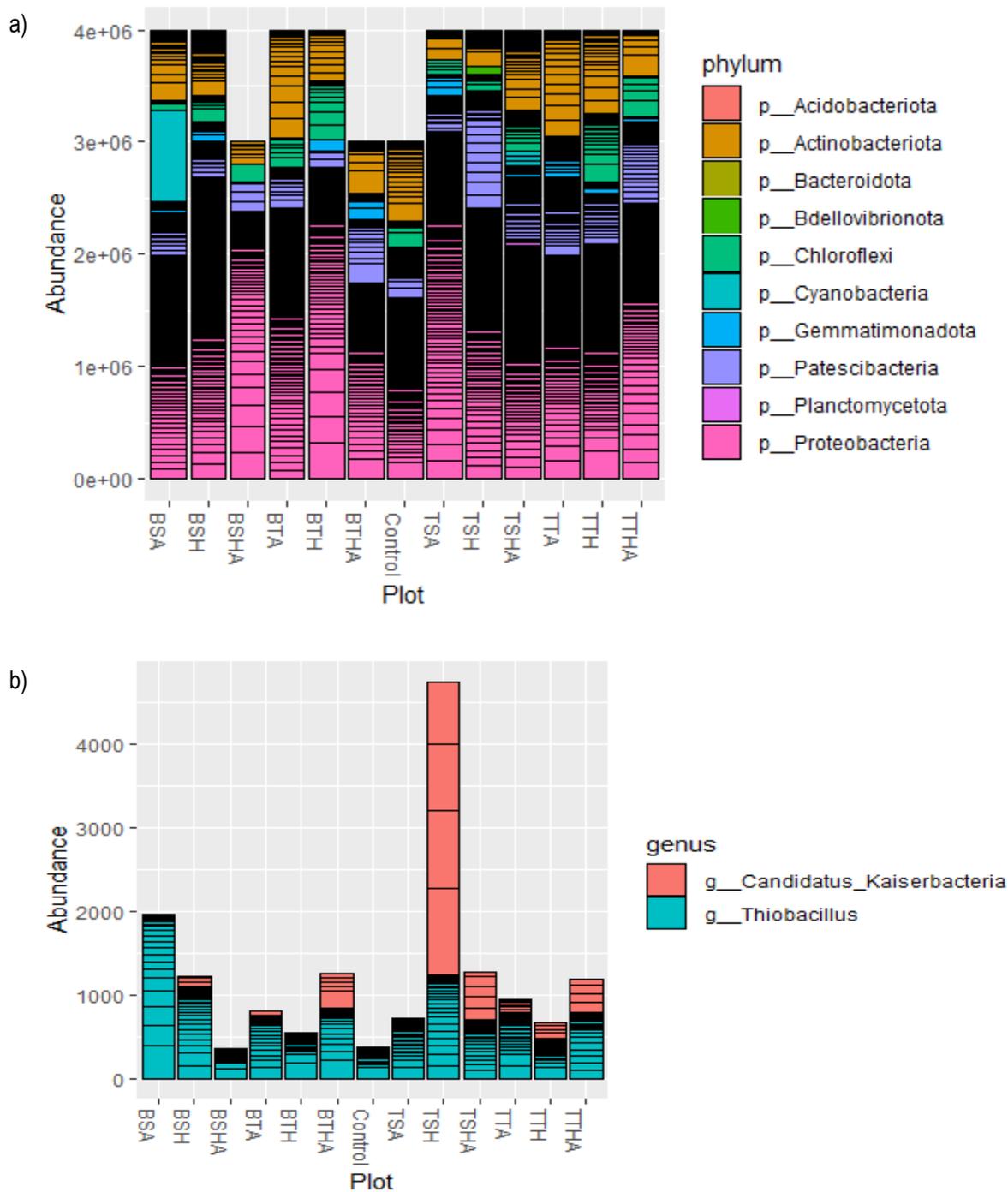


Figure 4 a) Abondance des taxons de bactéries regroupées au niveau du phylum selon les différentes combinaisons de traitements, b) Abondance des 10 genres les plus dominants. Les valeurs d'abondance pour chaque OTU sont empilées dans l'ordre du plus grand au plus petit, séparées par une fine ligne horizontale. La couleur des bandes représente le genre d'appartenance des OTUs. La lettre B représente l'amendement en biochar, la lettre S, l'amendement en microorganismes, la lettre A la plantation d'arbres, H, les herbacées et la lettre T représente les témoins. Les échantillons 'Control' proviennent de l'extérieur de la plantation.

Le nombre de taxons total obtenu est de 13 959 réparti en 32 phylums. La Figure 4a montre l'abondance taxonomique au niveau des phylums les plus abondants dans les groupes d'échantillons avec la même combinaison de traitement. Les analyses moléculaires ont montré un haut taux de dispersion dans les communautés bactériennes. Il y a eu 14 genres de bactéries dans deux phylums dominants soit en majorité des *Proteobacteria* (75 %) et des *Actinobacteriota* en moindre mesure (13 %). Les bactéries du genre *Thiobacillus* et *Candidatus Kaiserbacteria* sont les plus dominantes (Figure 4b). Or, aucun de ces deux genres ne se trouve dans le phylum *Actinobacteriota*, bien qu'étant un phylum représentant 75 % des taxons identifiés. Cela montre que les *Actinobacteriota* sont plus diversifiées que les *Patescibacteria*.

Les résultats de l'analyse canonique des corrélations (Tableau 6) qui compare les communautés bactériennes aux paramètres environnementaux, contenant à la fois les différents traitements expérimentaux, les paramètres physico-chimiques du sol et les données concernant les végétaux, montrent que ces variables environnementales n'ont pas eu d'effets significatifs sur les communautés bactériennes. En effet, seulement le bloc montre une p -value < 0,05, ce qui laisse à croire que d'autres paramètres du sol ont pu influencer les bactéries sans qu'il n'ait été possible de les identifier par cette recherche. Or, l'ordination des échantillons est tout de même présentée dans la Figure 5, le seuil significatif choisi est de 0,15 pour le bien de la représentation graphique. Ainsi, il est possible de voir qu'outre le facteur bloc, la concentration en azote du sol et la survie des arbres sont les deux autres paramètres qui ont le plus influencé les communautés bactériennes dans cette expérience.

Tableau 6 Résultats de l'analyse canonique des corrélations (CCA) des effets des paramètres environnementaux sur les communautés bactériennes.

Variables environnementales	R ²	P-value
Bloc	0,42	0,002**
Biochar	0,01	0,75
Inoculation	0,02	0,58
Mélange végétal	0,006	0,89
Couverture en herbacées	0,03	0,671
Taux de survie des arbres	0,14	0,12
pH	0,10	0,252
Conductivité électrique	0,07	0,37
Azote	0,13	0,14
Carbone	0,07	0,33
Souffre	0,06	0,43

** p -value < 0.01

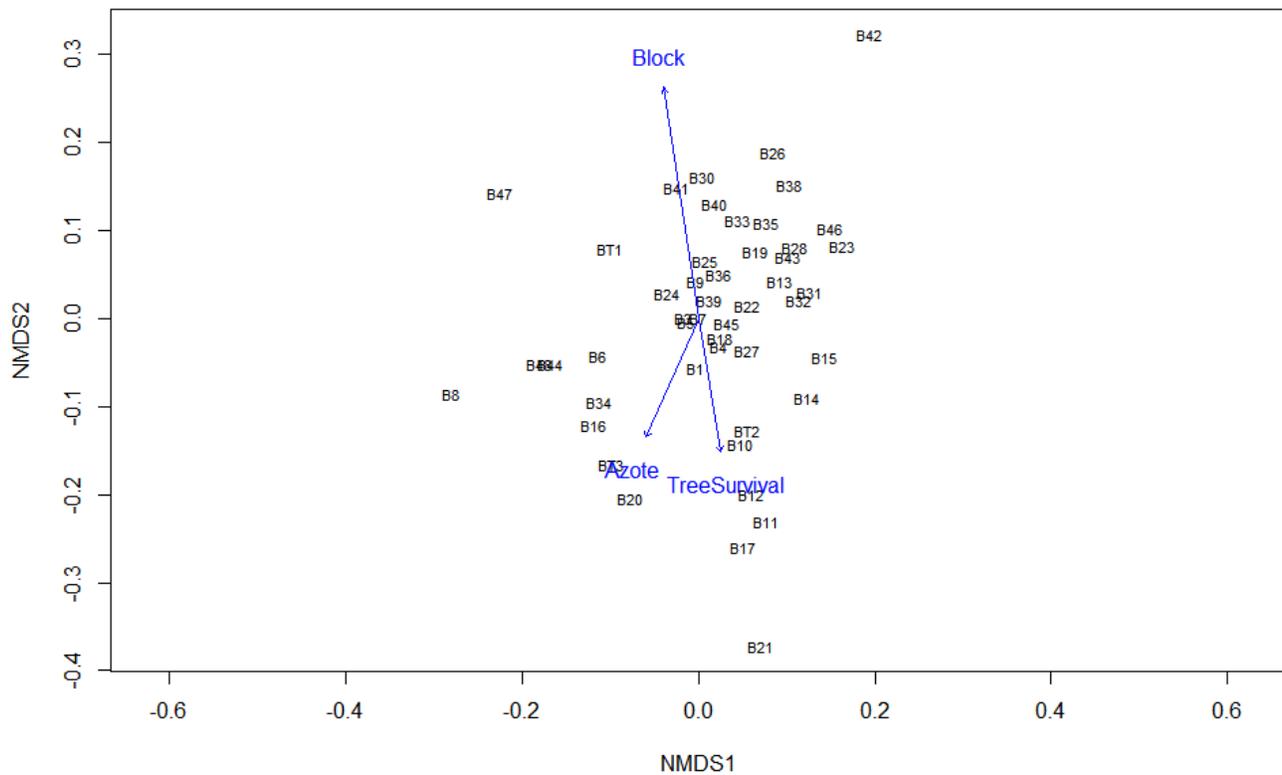


Figure 5 Tracé des deux premières dimensions, sur quatre, de l'ordination de mise à l'échelle dimensionnelle non métrique (stress = 0,11) de la composition des communautés bactériennes. Le seuil significatif utilisé est de 0,15. Seulement les deux premières dimensions sont présentées sur un total de quatre avec un facteur de stress de 0,11, cela représente tout de même la majorité de la variation ($R^2 = 0,963$).

Analyses des communautés fongiques

Le séquençage des échantillons de sol a permis d'obtenir un nombre de séquences de champignons (3 741 225, Tableau 7) similaires aux bactéries (3 457 690, Tableau 4). Un total de 1 687 726 séquences de champignons a été obtenu après la filtration et le nettoyage des données du séquençage des échantillons de sol, ce qui représente 42 % du nombre de séquences initial.

Tableau 7 Différents indices de diversité des communautés fongiques, présentés par traitement.

Traitements (n)	Nb de séquences initial	Nb de séquences finales	Richesse spécifique (OTUs)*	Indice de diversité de Shannon*	Indice d'équitabilité de Pielou	Diversité phylogénétique de Faith*
BSA (3)	155 315	64 992	40 ± 10	3,95 ± 0,28	0,75 ^a ± 0,03	12,33 ± 1,41
BSHA (4)	255 930	103 602	62 ± 17	4,81 ± 0,27	0,82 ^a ± 0,03	18,08 ± 4,29
BSH (4)	762 106	294 857	53 ± 26	3,98 ± 0,97	0,71 ^a ± 0,13	16,55 ± 5,99
TSA (4)	268 578	132 867	61 ± 23	4,15 ± 0,75	0,71 ^b ± 0,06	16,17 ± 5,88
TSHA (4)	255 246	105 459	61 ± 33	4,04 ± 1,02	0,69 ^b ± 0,08	16,05 ± 5,70
TSH (4)	272 766	152 673	52 ± 47	3,55 ± 2,13	0,67 ^b ± 0,18	14,95 ± 7,45
BTA (4)	212 457	73 489	76 ± 45	4,80 ± 0,75	0,79 ^a ± 0,05	20,71 ± 8,88
BTHA (4)	242 585	92 739	88 ± 46	4,61 ± 1,04	0,74 ^a ± 0,03	22,73 ± 8,52
BTH (4)	426 109	203 984	91 ± 13	5,01 ± 0,59	0,77 ^a ± 0,07	21,41 ± 3,71
TTA (4)	232 265	66 396	43 ± 14	3,71 ± 0,44	0,70 ^b ± 0,05	14,85 ± 2,64
TTHA (2)	223 952	121 093	77 ± 26	4,38 ± 0,15	0,71 ^b ± 0,03	19,92 ± 1,38
TTH (4)	288 102	172 753	80 ± 57	4,48 ± 1,09	0,73 ^b ± 0,06	19,19 ± 7,25
Hors de la plantation (2)	145 814	102 822	61 ± 52	3,61 ± 0,70	0,65 ^{ab} ± 0,04	17,85 ± 11,08
Total	3 741 225	1 687 726				

NB La lettre B représente l'amendement en biochar, S l'inoculation, H la plantation d'herbacées et A la plantation d'arbres. La lettre T représente les témoins, ou absence d'amendement. La richesse spécifique contient seulement les taxons qui sont présents dans au moins 10 % des échantillons contrairement au nombre d'OTUs qui est un total. Une lettre différente adjacente à la moyenne dans une même colonne montre une différence significative selon le test de Tukey (p -value < 0,05). *Aucune lettre n'est présentée puisque la p -value > 0,05.

Or, la richesse spécifique des champignons (entre 8 et 134 OTUs par échantillon) est en moyenne plus faible que celle des bactéries (entre 121 et 528 OTUs par échantillon). Les analyses de la diversité bêta n'ont pas montré de différences significatives entre les différents traitements pour ce qui est de l'indice de diversité de Faith, ni pour la richesse spécifique. Or, l'indice d'équitabilité de Pielou a montré un effet significatif positif du biochar (p -value de 0,0072) (voir Figure 6). Ainsi, les communautés fongiques issues d'un sol où il y a eu un amendement en biochar ont un indice de Pielou 10 % plus grand que celles où il n'y a pas de biochar.

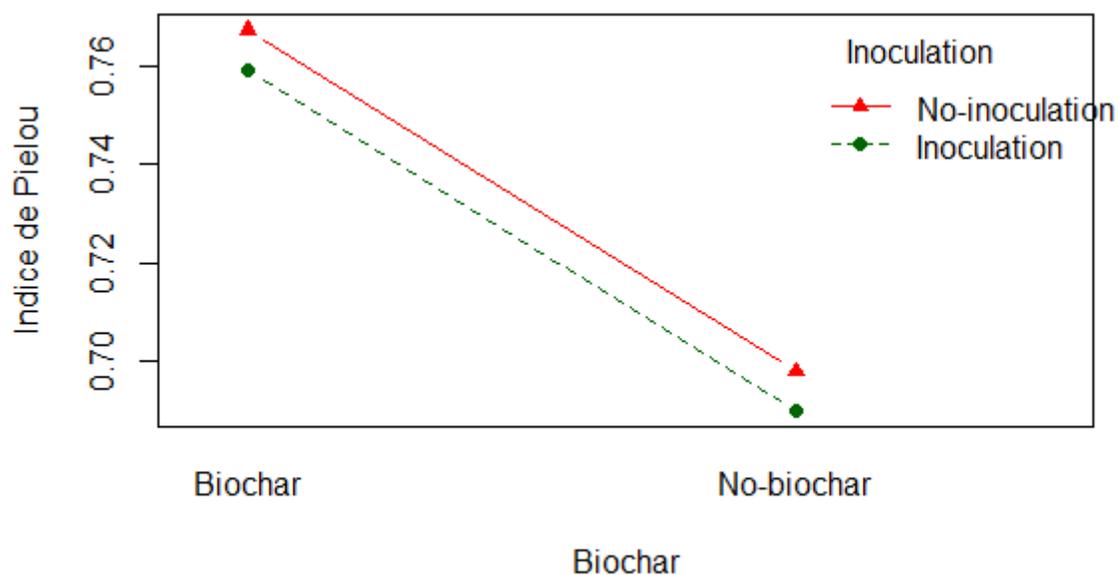


Figure 6 Représentation graphique de l'interaction entre l'inoculation et le biochar sur l'indice d'équitabilité de Pielou.

Il y a en tout 135 taxons de champignons (OTUs) qui ont pu être identifiés dans cette étude. Les analyses taxonomiques ont fait ressortir deux phylums plus abondants de champignons soit les *Basidiomycota* et les *Ascomycota* (Figure 7). Ainsi, 34 % des phylums identifiés sont des *Ascomycota* et 27 % sont des *Basidiomycota*. Le phylum *Mortierellomycota* se retrouve aussi, mais en faible abondance.

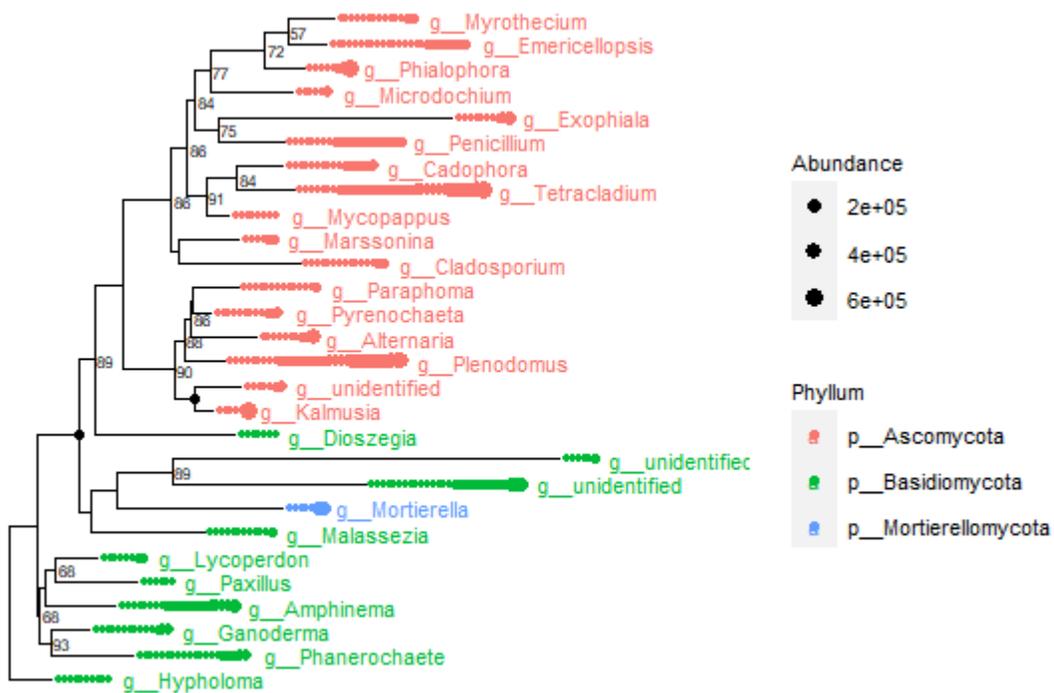


Figure 7 Arbre phylogénétique des champignons au niveau du phylum. Seulement les 100 taxons les plus abondants sont représentés. Les numéros représentent les 'bootstrap' et les points représentent un OTU, son abondance est montrée par la taille et son Phylum par la couleur. Le genre d'appartenance des OTUs est indiqué à la fin des branches.

Il est d'ailleurs possible d'observer que les échantillons témoins, qui proviennent de l'extérieur de la plantation, ont une abondance taxonomique inférieure par rapport aux sols où des végétaux ont été implantés. En tout, 14 genres de champignons ont pu être identifiés, avec une prédominance des genres *Plenodomus* et *Tetracladium* (Figure 8a). On peut d'ailleurs voir que la plupart des champignons les plus abondants n'ont pas pu être identifiés au niveau du genre dans cette analyse. D'autre part, *Cadophora finlandia*, qui faisait partie de l'inoculum lors de la plantation, a pu être identifié à un seuil de confiance de 99 %. De plus, *Rhizophagus irregularis*, qui est le seul champignon arbusculaire qui faisait partie de l'inoculum initial, fait partie de la famille des *Glomeraceae* détecté en très faible abondance. Finalement, *Tricholoma sculpturatum* pourrait aussi avoir persisté sur le terrain, malgré qu'une identification au niveau de l'espèce n'a pas pu être possible par cette étude.

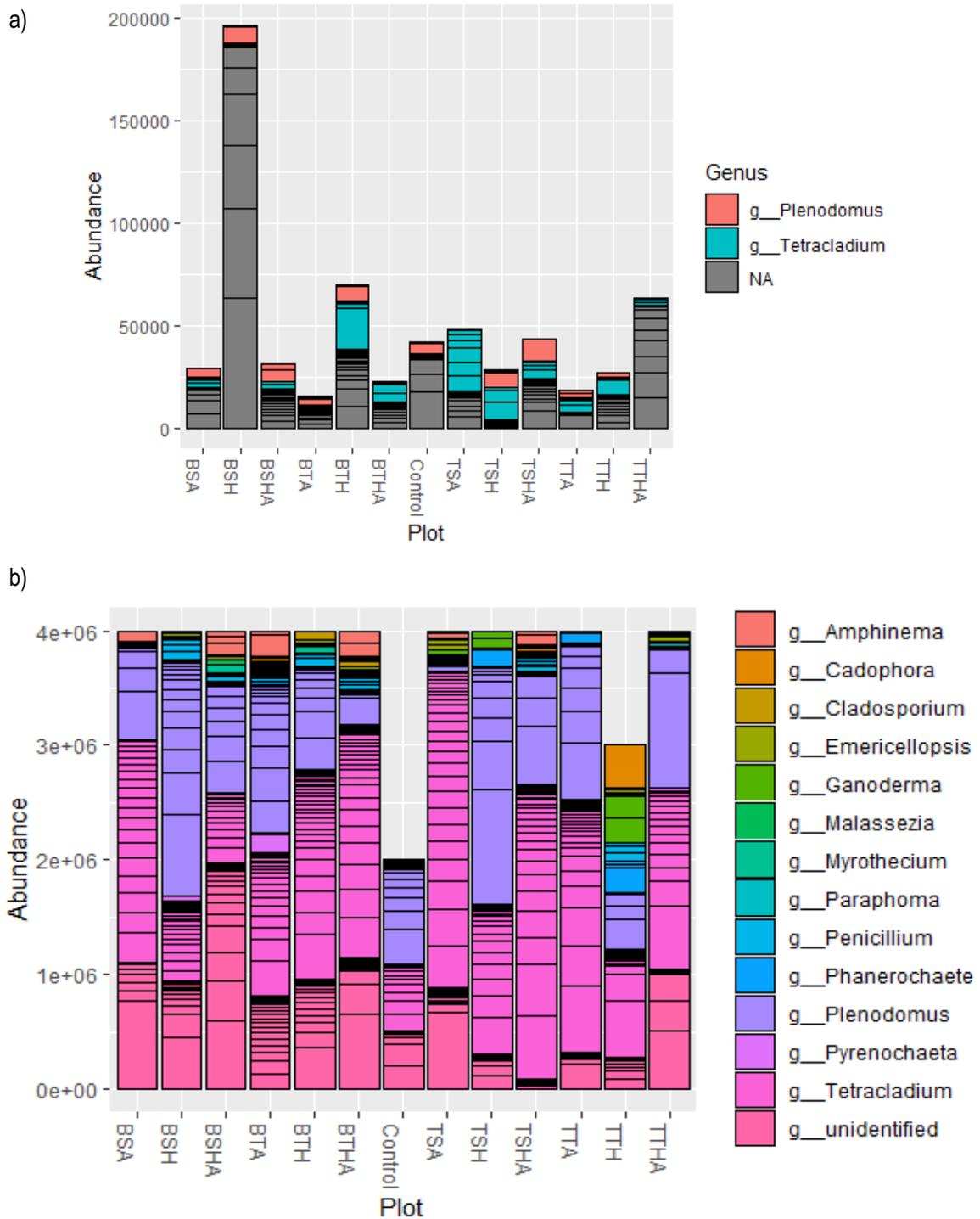


Figure 8 Abondance taxonomique des champignons a) les 10 taxons les plus dominants et b) tous les champignons dominants groupés au niveau du genre en fonction des traitements. Les valeurs d'abondance pour chaque OTU sont empilées dans l'ordre du plus grand au plus petit, séparées par une fine ligne horizontale. La couleur des bandes représente le genre d'appartenance des OTUs. La lettre B représente l'amendement en biochar, S l'inoculation, H la plantation d'herbacées et A la plantation d'arbres. La lettre T représente les témoins, ou absence d'amendement.

L'analyse canonique des corrélations des communautés fongiques mises en relation avec les variables environnementales provenant des données de croissance végétale et des analyses physico-chimiques montrent aucun effet n'est significatif à moins de 5 % d'incertitude (Tableau 8). Elle a été faite avec quatre dimensions afin d'obtenir un facteur de stress de 0,11. La Figure 10 montre l'effet des variables à 15 % de significativité et on peut y voir que le pH ($R^2 = 0,13$ et p -value 0,14) et le taux de carbone dans le sol ($R^2 = 0,19$ et p -value 0,06) peuvent tendre à influencer la diversité des communautés fongiques.

Tableau 8 Résultats de l'analyse multivariée des effets des paramètres environnementaux sur les communautés fongiques.

Variables environnementales	R^2	P -value
Block	0,02	0,78
Couverture en herbacées	0,02	0,77
pH	0,13	0,14
Conductivité électrique	0,02	0,69
Taux de survie des arbres	0,03	0,62
Azote	0,12	0,16
Carbone	0,19	0,06
Biochar	0,02	0,58
Inoculation	0,01	0,72
Mélange végétal	0,04	0,30

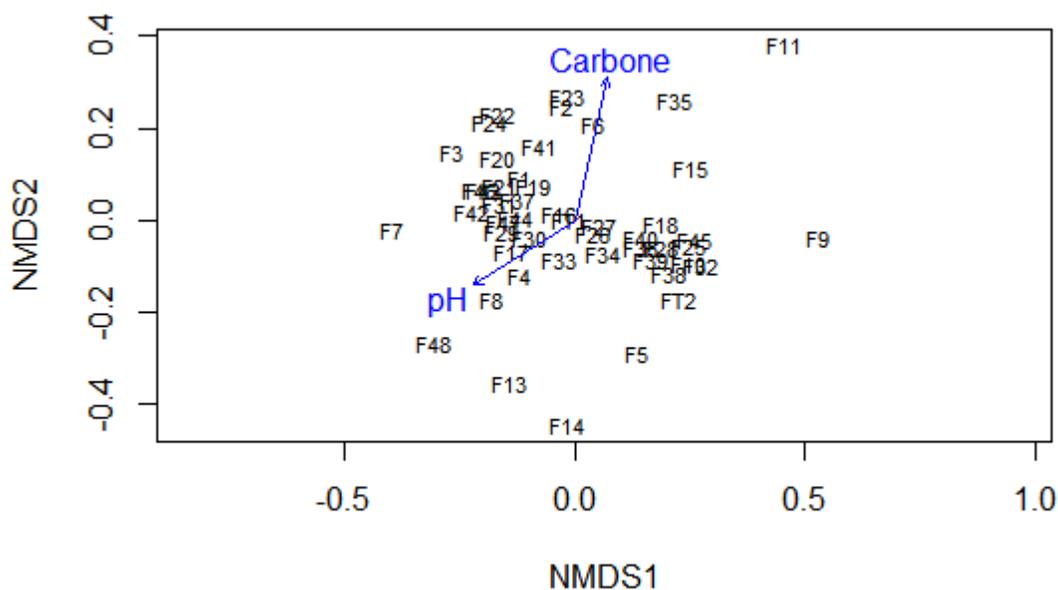


Figure 9 Tracé de l'ordination de mise à l'échelle dimensionnelle non métrique (stress = 0,11) de la composition des communautés fongiques. Le seuil significatif utilisé est de 0,15. Seulement les deux premières dimensions sont montrées ($R^2 = 95,6$).

Discussion

La survie des arbres est un paramètre important à mesurer dans un contexte de restauration écologique d'un site dégradé (Venier et al., 2014). En outre, la productivité végétale en termes de croissance est intéressante, car elle montre un indice de santé des arbres, mais la survie demeure le facteur crucial à la réussite en végétalisation. Dans le contexte de restauration d'un site minier en région nordique canadienne, les arbres doivent survivre dans un environnement extrême où à la fois le climat et les conditions édaphiques sont un défi pour la végétation. De plus, en restauration écologique, le but premier n'est pas la production forestière, mais plutôt la reconstruction d'un écosystème. Ainsi, une croissance rapide est moins importante que la robustesse de l'arbre face aux conditions difficiles pour conserver un couvert végétal.

Dans la présente étude, les différents systèmes de structure végétale n'ont pas eu d'effets significatifs sur la survie des végétaux. Cela montre qu'il n'y a pas eu ni facilitation ni compétition entre les espèces d'arbres sur le terrain. Cela doit être dû à la faible densité de la plantation et au jeune âge des arbres. En comparaison, dans une expérience en serre, l'effet de facilitation a été montré sur des résidus fins miniers avec une croissance plus élevée sur une densité plus élevée pour *P. glauca* et *S. arbusculoïdes* avec un effet positif net de la concurrence et de la facilitation (Asmara, 2020). Cela laisse croire que les résultats de la présente étude auraient pu être différents si les mesures avaient été prises à la maturité des arbres ou lorsque la compétition entre les arbres aurait été plus forte. Ainsi, il est important de comprendre le compromis entre la facilitation positive et la compétition négative, qui doit être bien géré pour améliorer les processus de succession dans les écosystèmes gravement perturbés tels que les sites miniers (Asmara, 2020; Markham et al., 2011).

Les résultats de la présente étude montrent un faible taux de survie de *P. tremuloïdes*, et ce malgré l'amendement en biochar et l'inoculation avec des microorganismes. Les peupliers faux-trembles (*P. tremuloïdes*) ont montré un taux de survie plus faible que les autres espèces, de même qu'un effet neutre ou négatif de l'inoculation. Cela pourrait indiquer une mauvaise adaptation de l'espèce avec les conditions édaphiques, ou bien une difficulté d'association avec les microorganismes symbiotiques (DesRochers et al., 2007) pour cette espèce qui est normalement colonisée à la fois par les champignons ectomycorhiziens et les champignons mycorhiziens arbusculaires (Khasa et al., 2002). Cette espèce, bien qu'utilisée en phytoremédiation pour sa croissance rapide et ses capacités de bioaccumulation des métaux lourds, a moins bien réagi aux conditions *in-situ*. D'autres analyses auraient dû être faites pour identifier plus précisément la ou les causes de cette faible performance. Par exemple, les peupliers ont pu être trop sensibles au stress hydrique, aux variations de température ou aux conditions de pH sur ce site minier. *A contrario*, dans nos résultats, il a été possible d'observer une bonne réponse de l'aulne (*A. viridis* ssp. *Crispa*) à l'inoculation, avec un taux de survie de 91 %. L'aulne crispé a longtemps été décrit comme une plante pionnière dans la conduite de la

succession primaire, en particulier parce qu'il a été démontré qu'il améliore la teneur en azote du sol et qu'il influence la colonisation par les espèces successives ultérieures (Knelman et al., 2018). Plusieurs études ont démontré l'intérêt d'utiliser l'aulne pour la restauration des sites miniers étant donné sa robustesse et sa capacité à créer des symbioses avec les bactéries, les endomycorhizes et les ectomycorhizes et sa capacité à enrichir le sol et à initier la succession végétale (Knelman et al., 2018; Roy et al., 2007). L'épinette blanche (*P. glauca*) et le saule arbustif (*S. arbusculoïdes*) ont aussi montré un taux de survie élevé sur le terrain, ce qui démontre leur capacité à résister aux conditions difficiles des résidus miniers. L'épinette blanche est d'ailleurs un arbre indigène de la région étudiée et représente une espèce dominante de la forêt boréale environnante, d'où son intérêt pour la végétalisation d'un site dégradé par l'activité minière en région nordique canadienne (Nadeau, 2015). D'autre part, les saules sont des arbustes qui sont souvent utilisés en phytoremédiation des sites miniers, car ils ont une forte tolérance aux sols contaminés par les métaux lourds (Guittonny-Larcheveque et Lortie, 2017). Ils peuvent survivre dans des conditions édaphiques extrêmes, mais Vanessa et al. (2017) ont montré dans leur étude que la combinaison d'un amendement en compost et d'une inoculation avec des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (*plant-growth promoting rhizobacteria*, PGPR) améliore la survie et la croissance des arbres.

D'autre part, l'amendement en biochar dans cette étude n'a pas été un facteur déterminant dans l'augmentation du taux de survie des végétaux. En effet, les résultats ont montré des effets parfois nuls, parfois négatifs. Or, le biochar aurait dû, en apportant une source de carbone dans le sol et en améliorant la structure du sol, améliorer la croissance végétale (Xie et Zyl, 2020). Ces résultats sont peut-être dus au fait que le biochar utilisé avait un pH de 8,39 (Allaire et al., 2015), sur le substrat qui était déjà alcalin. Peut-être qu'un biochar plus acide aurait permis de ramener le sol vers un pH plus neutre afin de favoriser la fertilité du sol. En effet, la disponibilité de six éléments minéraux majeurs (N, P, K S, Ca et Mg) pour la croissance végétale est favorisée avec un pH neutre, alors que la toxicité des métaux peut s'accroître avec un pH plus acide ou plus alcalin (Kelly et al., 2014). La densité d'application du biochar est aussi un facteur à prendre en compte dans son utilisation. Dans cette étude, l'application du biochar a été de 75 tonnes/ha en comparaison avec d'autres études où on retrouve de 1-80 tonnes/ha, comme reporté par la méta-analyse de (Jeffery et al., 2011). La densité d'application ne devrait donc pas être en cause dans la faible performance du biochar pour l'amélioration de la croissance végétale pour cette étude.

D'ailleurs, nos résultats ont montré que l'amendement en microorganismes symbiotiques a augmenté le taux de survie de *Alnus v. ssp. Crispa*, mais l'effet n'était pas significatif sur le taux de survie de *P. glauca*, *S. arbusculoïdes* et *P. tremuloïdes*. Bien que l'effet de l'inoculation n'ait été significatif que pour *Alnus v. ssp. Crispa*, il est possible d'observer graphiquement que les taux de survie de *P. glauca* et *S. arbusculoïdes* montrent une plus grande variance de la moyenne lorsque le plant n'a pas été inoculé (Figure 3). Cela montre

un plus grand risque de mort de l'arbre même s'il n'y a pas de différence significative de moyenne au niveau du groupe. En comparaison, sur ce même dispositif expérimental, il a été démontré qu'après deux saisons de croissance, il n'y avait pas d'évidence statistique que la survie des arbres était affectée par les traitements (Asmara, 2020). Toutefois, la croissance des *A. v. ssp. Crispa* avait été favorisée par l'inoculum et celle de *P. tremuloïdes* défavorisée par le même inoculum. Ainsi, les résultats positifs de l'effet de l'inoculum sur la survie des arbres trouvés dans notre étude après quatre saisons de croissance montrent que l'avantage de l'inoculum sur la résistance des arbres au stress est plus probant à moyen terme qu'à court terme.

Les résultats des analyses physico-chimiques ont montré un effet du biochar sur le pH, le taux de carbone et d'azote ainsi que sur le ratio C/N. Cela est représentatif de l'effet escompté du biochar sur les sols, étant de la matière organique pyrolysée, l'augmentation du taux de carbone dans le sol est inévitable. Le fait que le taux d'azote est aussi augmenté est caractéristique d'une activité microbienne, car c'est ce qui relie le cycle du carbone au cycle de l'azote (Raven et al., 2007). Il aurait été intéressant d'analyser les concentrations en azote assimilable par les plantes. Les paramètres physico-chimiques du sol n'ont pas été influencés par les autres traitements de cette étude soit l'inoculation des végétaux avec des microorganismes et le mélange végétal. Cela va à l'encontre de l'hypothèse initiale que les paramètres du sol varieraient en fonction des différents systèmes de plantation avec ou sans inoculation de microorganismes. En effet, les végétaux et les microorganismes interagissent avec le sol et la mobilisation des minéraux aurait dû être visible par des effets significatifs des traitements d'inoculation sur les paramètres physico-chimiques (Wong et al., 2007). Or, dans un dispositif de recherche *in-situ*, il y a plusieurs facteurs extérieurs qui ont pu contribuer à ces résultats après quatre ans, par exemple le retrait de la couche superficielle du sol à l'échantillonnage, ainsi que l'érosion hydrique ou éolienne a pu déplacer la litière formée par les végétaux.

La diversité des communautés bactériennes était assez élevée (indice de Shannon entre 6-8) dans tous les échantillons et l'effet des traitements était peu significatif. En comparaison, une étude des communautés bactériennes du sol avec des amendements en biochar de Wong et al. (2019) a montré des indices de diversité de Shannon autour de 3-4, dans une décharge de déchets nouvellement établie. Wong et al. (2019) ont d'ailleurs démontré que le biochar augmentait la diversité des communautés bactériennes tout en diminuant la dominance. Un indice de diversité plus élevé peut montrer une communauté qui n'est pas encore stable et qui présente beaucoup de compétitions interspécifiques. Cela est représentatif d'un écosystème jeune et en évolution (Regvar et al., 2006). Nos résultats sont semblables pour tous les indices de diversité des communautés bactériennes, car la diversité était assez élevée, mais la dominance plutôt faible et cela sans différence significative entre les traitements dans notre étude. Cela peut être dû à la dispersion des microorganismes sur le terrain ou à l'instabilité de la structure des communautés bactériennes. Il est possible qu'un échantillonnage répété sur plusieurs semaines ou plusieurs années aurait montré des tendances plus

marquées. Aussi, les résultats de cette étude montrent des interactions entre l'inoculation de microorganismes et l'amendement de biochar sur les indices de diversité des communautés bactériennes. Les interactions montrent donc un effet potentiel de ces facteurs sur les communautés sans que celui-ci n'ait pu être clairement identifié par notre étude. Des analyses plus approfondies devraient être faites afin d'améliorer la compréhension de cette interaction.

Au niveau des analyses taxonomiques des bactéries du sol, deux phylums ont été trouvés en abondance dans nos échantillons (*Actinobacteria* et *Proteobacteria*), présents dans tous les groupes et représentant 87 % de toutes les séquences identifiées. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans des échantillons de sol provenant de sites pollués par l'extraction du fer où six phylums dominants ont été identifiés soit *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, et *Gemmatimonadetes* (Hong et al., 2015). On peut aussi retrouver des résultats similaires dans l'étude de Awasthi et al. (2017), qui ont échantillonné des sols après trois mois sur le terrain et ont inféré le rôle des bactéries des phylums *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Firmicutes* dans la décomposition de la matière organique. Dans nos résultats, les bactéries du genre *Thiobacillus* sont parmi les plus abondantes et il a été démontré dans l'étude de Knelman et al. (2018) que la présence de celles-ci est corrélée à la présence d'épinettes et que leur abondance diminue en présence d'aulnes. L'abondance importante de ces bactéries sur notre site d'étude pourrait d'ailleurs être liée, entre autres, à la proximité de la forêt à forte dominance d'épinettes. De plus, le genre *Thiobacillus* a déjà été identifié dans des échantillons de sol provenant de résidus miniers avec une contamination en fer (Hong et al., 2015). La présence de *Picea glauca* dans la plantation et dans la forêt proximale du site de la présente étude pourrait ainsi expliquer la dominance du genre *Thiobacillus*.

La présence des bactéries inoculées lors de la plantation, *Pseudomonas putida*, *Azobacter chroococcum* et *Frankia alni*, ne peut pas être prouvée hors de tout doute, mais des indices de leur présence se retrouvent dans l'analyse moléculaire des échantillons de sol. En effet, la présence du genre *Pseudomonas*, dont fait partie *Pseudomonas putida*, de la famille *Pseudomonadaceae* et aussi de l'*Azobacter chroococcum* de cette même famille, et de l'ordre *Frankiales*, dont fait partie *Frankia alni*, pourraient indiquer que les bactéries inoculées à la plantation sont toujours présentes sur le terrain. Or, peut-être plusieurs échantillonnages faits en début de saison de croissance, au printemps, et en fin de saison de croissance à l'automne, et un échantillonnage répété à chaque année après l'implantation sur le terrain aurait pu permettre un meilleur suivi des inocula dans le sol. Or, nous n'avons pas pu observer une corrélation entre les paramètres physico-chimiques et les communautés bactériennes. La corrélation entre la présence d'azote et les communautés bactériennes est faible dans notre étude ($R^2 = 0,13$ et p -value 0,14). Les bactéries *Azobacter chroococcum* et *Pseudomonas putida* sont dites diazotrophes, c'est-à-dire qu'elles peuvent fixer l'azote atmosphérique en étant libres contrairement à celle des genres *Frankia* et *Rhizobium* qui doivent être associés aux plantes actinorhiziennes et légumineuses,

respectivement, pour pouvoir réaliser cette fixation (Smercina et al., 2019; Wagner, 2011). Par contre, Pagé et al. (2019) ont démontré que la concentration en azote dans le sol affecte directement la composition des communautés bactériennes, et ce, particulièrement dans un contexte de carence en azote. Certaines plantes peuvent collaborer avec des bactéries symbiotiques en partageant des fonctions du cycle de l'azote. L'étude de Pagé et al. (2019) démontre la capacité des plantes à s'associer à des microorganismes spécifiques selon les conditions édaphiques. Par exemple, le sol qui contient peu d'azote présente aussi peu de bactéries dépendantes de l'azote, comme celles de l'ordre des *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* ou *Cyanobacteriales* (Pagé et al., 2019). Jien et al. (2021) ont aussi trouvé des résultats similaires où la dominance des bactéries fixatrices d'azote était corrélée aux concentrations de carbone organique et d'azote inorganique dans une expérience sur le terrain avec des traitements d'amendement en matière organique sous forme de compost et de biochar.

D'autre part, Merilä et al. (2010) ont montré dans leur étude que les communautés fongiques regroupent majoritairement des champignons saprophytes lorsque les taux de carbone sont élevés. Inversement, les champignons mycorhiziens augmentent lorsque la concentration en azote est plus élevée. L'échantillonnage fait à l'automne dans cette étude, et un ratio C/N élevé pourrait ainsi expliquer la dominance des genres *Plenodomus* (Groenewald et al., 2017) dans nos échantillons. Les espèces du genre *Plenodomus* sont souvent considéré comme des pathogènes en agriculture (Groenewald et al., 2017). Or, leur présence dans ce contexte minier montre une résistance de ces champignons à la contamination par les métaux lourds et une certaine adaptation aux conditions arides du nord canadien. D'autre part, le genre *Tetracladium* s'est avéré dominant dans cette étude. Le genre *Tetracladium* avait d'ailleurs été identifié dans une mine avec des taux importants d'arsenic (Taleski et al., 2020). Un autre aspect à considérer dans cette étude est l'interaction entre les espèces végétales et les microorganismes. En effet, Knelman et al. (2018) ont démontré que la dominance des aulnes dans un milieu engendre une composition et une structure des communautés microbiennes spécifique et que ces communautés sont ensuite complètement modifiées lors de la succession écologique vers une forêt boréale dominée par les conifères. Une autre étude s'est intéressée aux ectomycorhizes et a pu déterminer que les communautés fongiques sont affectées à la fois par les conditions édaphiques et par la flore. En effet, dans cette étude, les communautés fongiques différaient entre les parcelles dominées par *P. tremuloïdes*, *P. glauca* ou *P. banksiana* et les champignons du genre *Amphinema* se retrouvaient préférentiellement en présence de *Picea glauca* (Kernaghan et al., 2002; Scott et al., 2019). Nos analyses ont permis de retracer certains champignons mycorhiziens fréquemment trouvés sur des sites contaminés comme *Cadophora finlandia* et *Amphinema ssp.*, leur adaptabilité à ce type de milieu extrême ayant déjà été observée (Nadeau et al., 2018a; Onwuchekwa et al., 2014).

Limites de l'étude

L'extraction de l'ADN des échantillons de sol a donné des concentrations entre 2 et 25 µg/µL; elles sont faibles tant pour les bactéries que pour les champignons, démontrant soit une faible quantité de microorganismes dans le sol, soit la présence d'inhibiteurs des réactions enzymatiques. L'extraction d'ADN des microorganismes issus des résidus miniers a présenté des défis avec des concentrations plutôt faibles. Malgré tout, seulement six échantillons de sol n'ont pas pu être utilisés pour les bactéries et quatre pour les champignons (Tableau 10; Tableau 11), cela a causé un problème statistique pour les comparaisons de diversité beta avec les communautés bactériennes. Ce problème aurait pu être évité en utilisant plus de répétitions soit un nombre plus élevé de blocs dans le dispositif expérimental. De plus, une optimisation du protocole d'extraction d'ADN pour des échantillons de sol de ces résidus miniers pourrait être faite, car certains composés chimiques, comme les métaux lourds, ont pu inhiber des réactions du kit d'extraction utilisé. De plus, les amorces utilisées pour la réplification des gènes de champignons étaient générales pour la région ITS, les amorces spécifiques aux CMA auraient pu être utilisées afin d'obtenir plus de séquences de *Glomus* ssp. (Senés-Guerrero et al., 2020; Suzuki et al., 2020; Xu et al., 2017). D'autre part, les courbes de raréfaction ont montré un plateau, on peut conclure que le séquençage a été suffisant.

Le risque de contamination sur le terrain est grand, voir inévitable puisqu'il n'y a aucune possibilité de la contrôler. En effet, la dispersion des microorganismes sur le terrain a pu amoindrir l'effet de nos traitements dans nos analyses sur les communautés. Toutefois, les microorganismes qui restent après des années sur le terrain sont ceux qui ont pu se trouver dans la niche écologique appropriée ou bien qui ont su s'adapter aux conditions du milieu. Ainsi, dans notre dispositif expérimental avec quatre espèces ligneuses, l'échantillonnage a été fait dans un quadrilatère à équidistance de chaque espèce. Or, le sol échantillonné a pu faire partie de la rhizosphère d'un arbre, sans que cela ne soit voulu. Ainsi, il aurait été possible de prendre plusieurs tubes de sol autour d'une parcelle pour obtenir un échantillon composite ou bien de prendre des échantillons du sol à proximité de chaque arbre avant de mélanger. De plus, il a été démontré que le sol provenant de la rhizosphère et le sol libre ne contenaient pas les mêmes types de microorganismes. Cela a pu influencer les résultats dans cette présente étude. L'idéal, afin d'évaluer l'effet de l'inoculation sur la croissance végétale, aurait été de savoir si les arbres avaient été colonisés avant la plantation sur le terrain et puis après quatre saisons de croissance, afin de confirmer les résultats obtenus dans la présente étude, comme l'a démontré Gagné et al. (2006) pour le suivi de la persistance des souches inoculées avec de marqueurs microsatellites. De plus, une meilleure connaissance de l'état initial au niveau des microorganismes et des paramètres physico-chimiques du sol aurait pu améliorer notre compréhension de l'effet des efforts de végétalisation sur ce site minier. Les communautés écologiques sont dynamiques, en constante évolution et toujours en interaction avec le milieu et les interactions avec les autres espèces. L'échantillonnage a d'ailleurs été fait une seule fois à l'automne, ce qui a pu biaiser

les résultats en favorisant les champignons décomposeurs au détriment des mycorhizes par exemple. En regardant un écosystème à un temps précis sans voir son évolution dans le temps, la compréhension du système est difficile et incomplète, seulement des hypothèses ou des pistes de conclusions peuvent être émises. La compréhension de la dynamique saisonnière des communautés mycorhiziennes est importante pour une meilleure gestion *in-situ* de ces dernières (Ji et al., 2021). Il reste beaucoup de questions sans réponse pour comprendre les interactions entre chaque espèce végétale et leur microbiote associé, les microorganismes du sol et les processus biogéochimiques.

Conclusion

L'objectif général de ce mémoire était d'évaluer le potentiel de différents systèmes d'implantation pour la végétalisation de résidus miniers issus de l'extraction chimique de l'or. La méthodologie utilisée a permis d'augmenter les connaissances sur la survie des arbres dans ces résidus miniers selon les traitements. Certaines interactions entre les paramètres physico-chimiques, les communautés microbiennes et la survie des arbres ont aussi pu être observées. Les espèces ligneuses ont eu un taux de survie global élevé, et cela plus particulièrement pour l'aulne et l'épinette blanche. Le taux de survie de l'aulne a été plus élevé lorsqu'il y avait eu un amendement en microorganismes symbiotiques. Le biochar, dans cette étude, n'a pas eu d'effet direct significatif sur la survie des arbres. Or, l'amendement en biochar a eu un effet sur plusieurs paramètres physico-chimiques comme le pH, la conductivité électrique, les concentrations en carbone et en azote total et sur le ratio C/N. Comme ces paramètres ont aussi une influence sur les communautés et la croissance végétale, on peut voir dans ces résultats que le biochar a pu avoir eu un effet indirect sur la survie des arbres. Le choix d'un biochar est un facteur de réussite pour son application (Allaire et al., 2015). En effet, l'utilisation d'un biochar avec un pH complémentaire au sol étudié, afin de rendre certains éléments minéraux plus disponibles, aurait peut-être pu améliorer les conditions de croissance pour les plantes. D'autre part, les analyses moléculaires ont permis d'apprécier la diversité des communautés bactériennes et fongiques du sol. Ces analyses ont permis d'observer la présence de certains microorganismes qui avaient été inoculés avant l'implantation des végétaux sur le terrain. L'échantillonnage unique qui a été fait à l'automne aurait favorisé un groupe particulier de bactéries et de champignons décomposeurs par rapport à d'autres. Un échantillonnage plus complet et répété durant la saison et entre les saisons de croissance aurait pu permettre d'apprécier une plus grande diversité, particulièrement pour les symbiontes, ainsi que leur dynamique spatio-temporelle. Parmi les espèces d'arbres utilisés, l'aulne et l'épinette blanche semblent les mieux adaptés à ces conditions édaphiques et climatiques. De plus, les microorganismes symbiotiques qui semblent aussi adaptés à cet environnement sont les bactéries du genre *Pseudomonas* et les champignons des genres *Amphinema* et *Cadophora*. Ce mémoire a permis de montrer la complexité de la végétalisation des sols dégradés par l'activité minière en région nordique canadienne. Ces résultats montrent l'importance de la sélection pour chaque espèce végétale des souches spécifiques écologiquement bien adaptées au site de plantation (Nadeau et al., 2018a, 2018b), de décrypter les microbiomes racinaires en vue de l'ingénierie des microbiomes racinaires pour des plantes et des sols plus sains à l'aide de bio-inoculants bénéfiques de nouvelle génération sans danger pour l'environnement (Martinez-Hidalgo et al., 2019). L'analyse des réseaux des microbiomes et leur fonctionnement, l'écologie et la modélisation à plusieurs échelles (plante individuelle, communauté de plantes au sein d'un écosystème) sont essentielles pour une meilleure gestion des interactions trophiques (Hu et al., 2020; Simard et al., 2012). Plusieurs thèmes restent à explorer en ce qui concerne les interactions entre le sol, les microorganismes et les

végétaux et cela surtout dans une perspective à moyen ou long terme sur le suivi des dispositifs expérimentaux sur le terrain.

Bibliographie

- Abarenkov, K., Zirk, A., Piirmann, T., Pöhönen, R., Ivanov, F., Nilsson, R.H., Kõljalg, U., 2020. UNITE QIIME release for fungi [WWW Document]. URL <https://dx.doi.org/10.15156/BIO/786385>
- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in the Terrestrial Environment - Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals, 2e édition. ed. Springer-Verlag New-York.
- Allaire, S.E.S., Lange, S.F.S., Auclair, I.K.I., Quinche, M., Greffard, L., 2015. Analyses of biochar properties. Univ. Laval 59. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2789.4241>
- Asmara, D.H., 2020. Agroforestry on post-mining restoration : a challenge beyond plant mixture systems. Thèse de doctorat. Université Laval.
- Association minière du Canada, 2020. Le Plan Canadien pour les Minéraux et les Métaux.
- Atangana, A., Khasa, D., Chang, S., Degrande, A., 2014. Tropical agroforestry, Tropical Agroforestry. Springer Science + Business Media, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7723-1>
- Awasthi, M.K., Li, J., Kumar, S., Awasthi, S.K., Wang, Q., Chen, H., Wang, M., Ren, X., Zhang, Z., 2017. Effects of biochar amendment on bacterial and fungal diversity for co-composting of gelatin industry sludge mixed with organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* 246, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.068>
- Axygen Biosciences, 2013. AxyPrep Mag PCR clean-up protocol. Union City, CA 94587 USA.
- Azaiez, A., Beaudoin Nadeau, M., Bertrand, A., Khasa, D.P., 2018. In vitro selection of ecologically adapted ectomycorrhizal fungi through production of fungal biomass and metabolites for use in reclamation of biotite mine tailings. *Mycologia* 00, 1–16. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1520036>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B.M., Walker, S.C., 2020. Package “lme4” Linear Mixed-Effects Models using “Eigen” and S4. <https://github.com/lme4/lme4/>
- Beals, E.W., 1984. Bray-curtis ordination: An effective strategy for analysis of multivariate ecological data. *Adv. Ecol. Res.* 14, 1–55. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60168-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60168-3)
- Beaudoin-Nadeau, M., Gagné, A., Bissonnette, C., Bélanger, P.-A., Fortin, J.A., Roy, S., Greer, C.W., Khasa, D.P., 2016. Performance of ectomycorrhizal alders exposed to specific Canadian oil sands tailing stressors under in vivo bipartite symbiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* 62, 543–549. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0703>
- BioRad, 2012. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3 . 8 User ' s Manual. No J. 11, 10. www.nanodrop.com
- Bisanz, J.E., 2018. QIIME2R: Importing QIIME2 artifacts and associated data into R sessions. 10.1038/s41587-019-0209-9
- Bissonnette, L., St-Arnaud, M., Labrecque, M., 2010. Phytoextraction of heavy metals by two *Salicaceae* clones in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi during the second year of a field trial. *Plant Soil* 332, 55–67. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0273-x>
- Blais, J.-F., 1991. Évaluation environnementale de la Politique de contrôle des drainages miniers acides: Le cas des choix technologiques. Québec. <http://espace.inrs.ca/id/eprint/640>
- Bois, G., Bertrand, A., Piché, Y., Fung, M., Khasa, D.P., 2005. Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. *Mycorrhiza* 16, 99–109. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0020-y>
- Bokulich, N.A., Kaehler, B.D., Rideout, J.R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G.A., Gregory Caporaso, J., 2018. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* 6, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K. Bin, Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille,

- M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Lofffield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., Mclver, L.J., Melnik, A. V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bousquet, P., 2000. Application de silicates sur la pyrite pour prévenir le drainage minier acide. Thèse M. Sc. Université Laval.
- Brundrett, M.C., 2017. Global diversité and importance of mycorrhizal and nonmycorrhizal plants. *Ecol. Stud.* 230, 533–556. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_21
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callahan, B.J., Sankaran, K., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2017. Workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses [WWW Document]. URL <https://bioconductor.org/help/course-materials/2017/BioC2017/Day1/Workshops/Microbiome/MicrobiomeWorkflowI.html#methods> (accessed 1.21.21).
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat. Publ. Gr.* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- CEAEQ (Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec), 2015. Détermination de la conductivité : méthode électrométrique. MA115 Cond 1.1. Ministère du Développement durable, l'Environnement la Lutte contre les Changements Climatiques. 1–9.
- CEAEQ (Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec), 2014. MA.100-pH 1.1 Rev3. Méthode d'analyse: Détermination du pH, méthode électrométrique. Ministère du Développement Durable, de l'Environnement, des Forêts et des parcs. 11p.
- Clewell, A., Aronson, J., Winterhalder, K., 2004. The SER international primer on ecological restoration.
- Clewell, B.A., Aronson, J., 2013. The SER primer and climate change. *Ecol. Manag. Restor.* 14, 182–186. <https://doi.org/10.1111/emr.12062>
- Cristofoli, S., Mahy, G., 2010. Restauration écologique : contexte , contraintes et indicateurs de suivi. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16.
- DesRochers, A., Driessche, R. van den, Thomas, B.R., 2007. The interaction between nitrogen source , soil pH , and drought in the growth and physiology of three poplar clones. *Can. J. Bot.* 85, 1046–1057. <https://doi.org/10.1139/B07-062>
- Environment Canada, 2017. Canadian Climate Normals 1981-2010 Station Data - Climate - Environment and Climate Change Canada. Meteorol. Serv. Canada.
- Ericson, L., 1980. The downward migration of plants on a rising bothnian sea-shore. *Acta Phytogeogr. Suec.* 68, 61–72.
- Ezeokoli, O.T., Mashigo, S.K., Maboeta, M.S., Bezuidenhout, C.C., Khasa, D.P., Adeleke, R.A., 2020. Arbuscular mycorrhizal fungal community differentiation along a post-coal mining reclamation chronosequence in South Africa: A potential indicator of ecosystem recovery. *Appl. Soil Ecol.* 147, 103429. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103429>
- Faith, D.P., 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol. Conserv.* 61, 1–10.
- FAO, 2017. Carbone Organique du Sol: une richesse invisible. Rome, Italie.

- Gagné, A., Jany, J., Bousquet, J., Khasa, D.P., 2006. Ectomycorrhizal fungal communities of nursery-inoculated seedlings outplanted on clear-cut sites in northern Alberta. *Can. J. For. Res.* 36, 1684–1694. <https://doi.org/10.1139/X06-063>
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Glick, B.R., 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* 55, 501–514. <https://doi.org/10.1139/W09-010>
- Göhre, V., Paszkowski, U., 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115–1122. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0225-0>
- Goltapeh, E.M., Danesh, Y.R., Varma, A., 2013. *Fungi as bioremediators*, Soil Biology. Springer Heidelberg New York Dordrecht London Library.
- González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Gutiérrez-Castorena, M.C., 2009. Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: The role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Hazard. Mater.* 161, 1288–1298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.110>
- Gouvernement du Canada 2020. Le plan canadien pour les minéraux et les métaux. Disponible sur le site du rncan.gc.ca
- Groenewald, J.Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S., Barnes, I., Bensch, K., Braun, U., Camporesi, E., 2017. Genera of phytopathogenic fungi : GOPHY 1. *Stud. Mycol.* 86, 99–216. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>
- Guitttonny-Larcheveque, M., Lortie, S., 2017. Above- and belowground development of a fast-growing willow planted in acid-generating mine technosol. *J. Environ. Qual.* 46, 1462–1471. <https://doi.org/10.2134/jeq2017.03.0128>
- Homagain, K., Shahi, C., Luckai, N., Sharma, M., 2014. Biochar-based bioenergy and its environmental impact in Northwestern Ontario Canada: A review. *J. For. Res.* 25, 737–748. <https://doi.org/10.1007/s11676-014-0522-6>
- Hong, C., Si, Y., Xing, Y., Li, Y., 2015. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 10788–10799. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4186-3>
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R.M., Schuetzenmeister, A., Scheibe, S., 2020. Package ‘multcomp’, 1.4-15. ed. <http://multcomp.r-forge.r-project.org>
- Hu, Q., Tan, L., Gu, S., Xiao, Y., Xiong, X., Zeng, W., Feng, K., Wei, Z., Deng, Y., 2020. Network analysis infers the wilt pathogen invasion associated with non-detrimental bacteria. *Biofilms and Microbiomes* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0117-2>
- Jeffery, S., Verheijem, F.G., Velde, M. van der, Bastos, A.C., 2011. A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.* 144, 175–187.
- Ji, L., Yang, Y., Yang, N., Khan, A., Yang, L., 2021. Seasonal variation of diversity and co-occurrence patterns of arbuscular mycorrhizal fungal communities in mixed broadleaf-conifer forests. *Appl. Soil Ecol.* 158, 9. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103782>
- Jien, S.-H., Kuo, Y.-L., Liao, C.-S., Wu, Y.-T., Tsang, A.D., Igalavithana, D.C.W., Ok, Y.S., 2021. Effects of field scale in situ biochar incorporation on soil environment in a tropical highly weathered soil. *Environ. Pollut.* 272, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116009>
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kelly, C.N., Peltz, C.D., Stanton, M., Rutherford, D.W., Rostad, C.E., 2014. Biochar application to hardrock mine tailings: Soil quality, microbial activity, and toxic element sorption. *Appl. Geochemistry* 43, 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.02.003>
- Kernaghan, G., Hambling, B., Fung, M., Khasa, D., 2002. In vitro selection boreal ectomycorrhizal fungi for use in reclamation of saline-alkaline habitats. *Restor. Ecol.* 10, 43–51. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100X.2002.10105.x>
- Khalid, M., Ur-Rahman, S., Hassani, D., Hayat, K., Zhou, P., Hui, N., 2021. Advances in fungal-assisted phytoremediation of heavy metals: A review. *Pedosphere* 31, 475–495. <https://doi.org/10.1016/S1002->

0160(20)60091-1

- Khasa, P.D., Chakravarty, P., Robertson, A., Thomas, B.R., Dancik, B.P., 2002. The mycorrhizal status of selected poplar clones introduced in Alberta. *Biomass and Bioenergy* 22, 99–104. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(01\)00072-1](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(01)00072-1)
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Knelman, J.E., Graham, E.B., Prev y, J.S., Robeson, M.S., Kelly, P., Hood, E., Schmidt, S.K., 2018. Interspecific plant interactions reflected in soil bacterial community structure and nitrogen cycling in primary succession. *Front. Microbiol.* 9, 128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00128>
- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., W.Kuyper, T., Breemen, N. van, 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol. Evol.* 16, 248–254.
- LECO corporation, 2019. Corporate Product Overview. St-Joseph, MI.
- Lenth, R. V., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Riebl, H., Singmann, H., 2020. Package “emmeans.” <https://doi.org/10.1080/00031305.1980.10483031>>.License
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Lozupone, C.A., Hamady, M., Kelley, S.T., Knight, R., 2007. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
- Ludwig, W., 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.023>
- Luo, C., Deng, Y., Inubushi, K., Liang, J., Zhu, S., Wei, Z., Guo, X., Luo, X., 2018. Sludge biochar amendment and alfalfa revegetation improve soil physicochemical properties and increase diversity of soil microbes in soils from a rare earth element mining wasteland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050965>
- Markham, J., Young, I., Renault, S., 2011. Plant facilitation on a mine tailings dump. *Restor. Ecol.* 19, 569–571. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2011.00801.x>
- Martinez-Hidalgo, P., Maymon, M., Pule-Meulenberg, F., Hirsch, A.M., 2019. Engineering root microbiomes for healthier crops and soils using beneficial environmentally safe bacteria. *Can. J. Microbiol.* 65, 91–104. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0315>
- McDonald, D., Clemente, J.C., Kuczynski, J., Rideout, J.R., Stombaugh, J., Wendel, D., Wilke, A., Huse, S., Hufnagle, J., Meyer, F., Knight, R., Caporaso, J.G., 2012. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: How I learned to stop worrying and love the ome-ome. *Gigascience* 464, 1–6. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-7>
- McKinney, W., 2010. Data Structures for Statistical Computing in Python. *Proc. 9th Python Sci. Conf.* 1, 56–61. <https://doi.org/10.25080/majora-92bf1922-00a>
- Mcmurdie, A.P.J., Holmes, S., Jordan, G., Chamberlain, S., 2021. Package ‘phyloseq’ Handling and analysis of high-throughput microbiome census data [WWW Document]. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217> (accessed 2.11.21).
- MDELCC, 2017. Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, Gouvernement du Québec. <https://doi.org/ISBN-2-551-18001-5>
- Merilä, P., Malmivaara-L ms , M., Spetz, P., Stark, S., Vierikko, K., Derome, J., Fritze, H., 2010. Soil organic matter quality as a link between microbial community structure and vegetation composition along a successional gradient in a boreal forest. *Appl. Soil Ecol.* 46, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.08.003>
- MERN, 2017. Guide de préparation du plan de r am nement et de restauration des sites miniers au Québec. Québec, Québec, Canada. mern.gouv.qc.ca/mines/publications/index.jsp
- Mo Bio Laboratories, 2013. PowerSoil DNA Isolation Kit. *Instr. Man.* 91, 16. ISSN 14665123.
- MRN, 2003. Zones de végétation et domaines bioclimatiques du Québec. <https://mffp.gouv.qc.ca/publications/forets/connaissances/zone-vegetation-2003.pdf>

- Nadeau, B., 2015. Development of a new green technology for the revegetation of abandoned gold mine tailings using specific symbionts associated with "picea glauca." Thèse de doctorat. Université Laval.
- Nadeau, M.B., Khasa, D.P., 2016. Edaphic selection pressures as drivers of contrasting white spruce ectomycorrhizal fungal community structure and diversity in the Canadian boreal forest of Abitibi-Témiscamingue region. *PLoS One* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166420>
- Nadeau, M.B., Laur, J., Khasa, D.P., 2018a. Mycorrhizae and Rhizobacteria on Precambrian Rocky Gold Mine Tailings: I. Mine-adapted symbionts promote white spruce health and growth. *Front. Plant Sci.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01267>
- Nadeau, M.B., Laur, J., Khasa, D.P., 2018b. Mycorrhizae and rhizobacteria on Precambrian Rocky Gold Mine Tailings: II. Mine-adapted symbionts alleviate soil element imbalance for a better nutritional status of white spruce seedlings. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01268>
- New England Biolabs, 2020. PCR Using Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (M0493) [WWW Document]. URL <https://international.neb.com/protocols/2012/08/30/pcr-using-q5-hot-start-high-fidelity-dna-polymerase-m0493>
- Oksanen, J., 2020. Vegan: an introduction to ordination. *Management* 1, 1–12.
- Onwuchekwa, N.E., Zwiazek, J.J., Quoreishi, A., Khasa, D.P., 2014. Growth of mycorrhizal jack pine (*Pinus banksiana*) and white spruce (*Picea glauca*) seedlings planted in oil sands reclaimed areas. *Mycorrhiza* 24, 431–441. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0555-x>
- Pagé, A.P., Tremblay, J., Masson, L., Greer, C.W., 2019. Nitrogen- and phosphorus-starved *Triticum aestivum* show distinct belowground microbiome profiles. *PLoS One* 14, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210538>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M., Duchesnay, É., 2011. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* 12, 2825–2830.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., EISPAC authors, Heisterkamp, S., Willigen, B. Van, Lehmann, J., 2020. Package "nlme": Linear and Nonlinear Mixed Effects Models [WWW Document]. CRAN. URL <https://svn.r-project.org/R/packages/trunk/nlme/> (accessed 1.21.21).
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2007. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Pulford, I.D., Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - A review. *Environ. Int.* 29, 529–540. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00152-6)
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing [WWW Document]. URL <https://www.r-project.org/>
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 2007. Biologie végétale, in: Université De Boeck (Ed.), . Bruxelles, Belgique, pp. 645–666.
- Regvar, M., Vogel-Mikuš, K., Kugonič, N., Turk, B., Batič, F., 2006. Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted site: Indications for the direction of phytostabilisation? *Environ. Pollut.* 144, 976–984. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.036>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 2016, 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Roy, S., Khasa, D.P., Greer, C.W., 2007. Combining alders, frankiae and micorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. *Can. J. Bot.* 85, 237–251. <https://doi.org/10.1139/B07-017>
- Ruiz-lozano, J.M., Azco, R., 2011. Endospore-forming Soil Bacteria. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 348 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8>
- Sánchez-Castro, I., Gianinazzi-Pearson, V., Cleyet-Marel, J.C., Baudoin, E., van Tuinen, D., 2017.

- Glomeromycota* communities survive extreme levels of metal toxicity in an orphan mining site. *Sci. Total Environ.* 598, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.084>
- Scott, N., Pec, G.J., Karst, J., Landhäusser, S.M., 2019. Additive or synergistic ? Early ectomycorrhizal fungal community response to mixed tree plantings in boreal forest reclamation. *Oecologia* 189, 9–19. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4241-0>
- Senés-Guerrero, C., Giménez, S., Pacheco, A., Gradilla-Hernandez, M.S., Schüßler, A., 2020. New MiSeq based strategy exposed plant-preferential arbuscular mycorrhizal fungal communities in arid soils of Mexico. *Symbiosis* 81, 235–246. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00698-5>
- Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J., Teste, F.P., 2012. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biol. Rev.* 26, 39–60. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.01.001>
- Smercina, D.N., Evans, S.E., Friesen, M.L., Lisa K. Tiemann, 2019. To Fix or Not To Fix : Controls on Free-Living Nitrogen Fixation in the Rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, 1–14.
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd Edition. Academic Press. London. 800p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Suzuki, K., Takahashi, K., Harada, N., 2020. Evaluation of primer pairs for studying arbuscular mycorrhizal fungal community compositions using a MiSeq platform. *Biol. Fertil. Soils* 56, 853–858. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01431-6>
- Taleski, V., Dimkic, I., Boev, B., Boev, I., Zivkovi, S., Stankovic, S., 2020. Bacterial and fungal diversity in the lorandite (TIAS 2) mine ‘ Allchar ’ in the Republic of North Macedonia . *FEMS Microbiol. Ecol.* 96, 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa155>
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Pölme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, R.H., Hildebrand, F., Bork, P., Abarenkov, K., 2015. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys* 10, 1–43. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852>
- Tedersoo, L., Liiv, I., Kivistik, P.A., Anslan, S., Kõljalg, U., Bahram, M., 2016. Genomics and metagenomics technologies to recover ribosomal DNA and single-copy genes from old fruitbody and ectomycorrhiza specimens. *MycKeys* 13, 1–20. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.13.8140>
- Vanessa, Á.L., Ángeles, P.F., Sergio, R., Beatriz, R.G., Rolf, H., Markus, P., Susan, K.P., 2017. Evaluating phytoextraction efficiency of two high-biomass crops after soil amendment and inoculation with rhizobacterial strains. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 7591–7606. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8366-1>
- Venier, L.A., Thompson, I.D., Fleming, R., Malcolm, J., Aubin, I., Trofymow, J.A., Langor, D., Sturrock, R., Patry, C., Outerbridge, R.O., Holmes, S.B., Haeussler, S., De Grandpré, L., Chen, H.Y.H., Bayne, E., Arsenault, A., Brandt, J.P., 2014. Effects of natural resource development on the terrestrial biodiversity of Canadian boreal forests. *Environ. Rev.* 22, 457–490. <https://doi.org/10.1139/er-2013-0075>
- Vodouhe, F.G., Khasa, D.P., 2015. Local community perceptions of mine site restoration using phytoremediation in Abitibi-Temiscamingue (Quebec). *Int. J. Phytoremediation* 17, 962–972. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.981238>
- Wagner, S.C., 2011. Biological nitrogen fixation. *Nat. Educ. Knowl.* 3, 15.
- Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J.R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E.R., Knight, R., 2017. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>
- Wong, C.C., Wu, S.C., Kuek, C., Khan, A.G., Wong, M.H., 2007. The role of mycorrhizae associated with vetiver grown in Pb-/ Zn-contaminated soils: Greenhouse study. *Restor. Ecol.* 15, 60–67. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2006.00190.x>
- Wong, J.T.F., Chen, X., Deng, W., Chai, Y., Ng, C.W.W., Wong, M.H., 2019. Effects of biochar on bacterial communities in a newly established landfill cover topsoil. *J. Environ. Manage.* 236, 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.010>
- Xie, L., Zyl, D. van, 2020. Distinguishing reclamation, revegetation and phytoremediation, and the importance

- of geochemical processes in the reclamation of sulfidic mine tailings: A review. *Chemosphere* 252, 12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126446>
- Xu, X., Chen, C., Zhang, Z., Sun, Z., Chen, Y., Jiang, J., Shen, Z., 2017. The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Chenopodium ambrosioides* revealed by MiSeq sequencing investigation. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep45134>
- Zhang, M., Wang, J., Bai, S.H., Teng, Y., Xu, Z., 2018. Evaluating the effects of phytoremediation with biochar additions on soil nitrogen mineralization enzymes and fungi. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 23106–23116. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2425-0>

Annexe A Figures supplémentaires

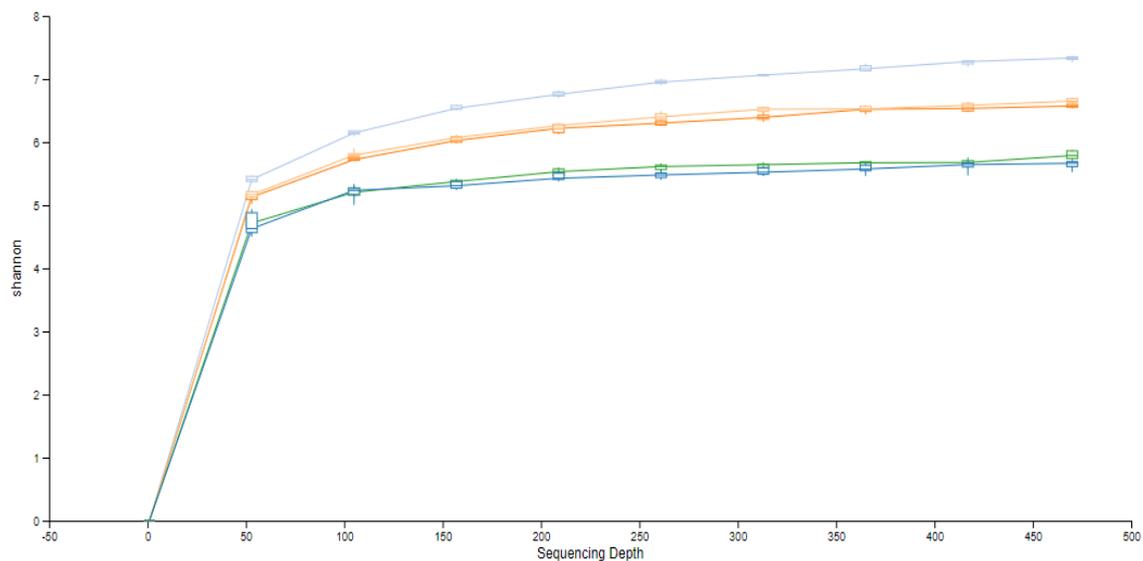


Figure 10 Réprésentation graphique de la courbe de raréfaction pour le calcul de diversité de Shannon

Tableau 9 Descriptif des noms des traitements abrégés

BSA	Biochar + Inoculation + Arbres
BSHA	Biochar + Inoculation + Arbres + Herbacées
BSH	Biochar + Inoculation + Herbacées
TSA	Inoculation + Arbres
TSHA	Inoculation + Arbres + Herbacées
TSH	Inoculation + Herbacées
BTA	Biochar + Arbres
BTHA	Biochar + Arbres + Herbacées
BTH	Biochar + Herbacées
TTA	Arbres
TTHA	Arbres + Herbacées
TTH	Herbacées

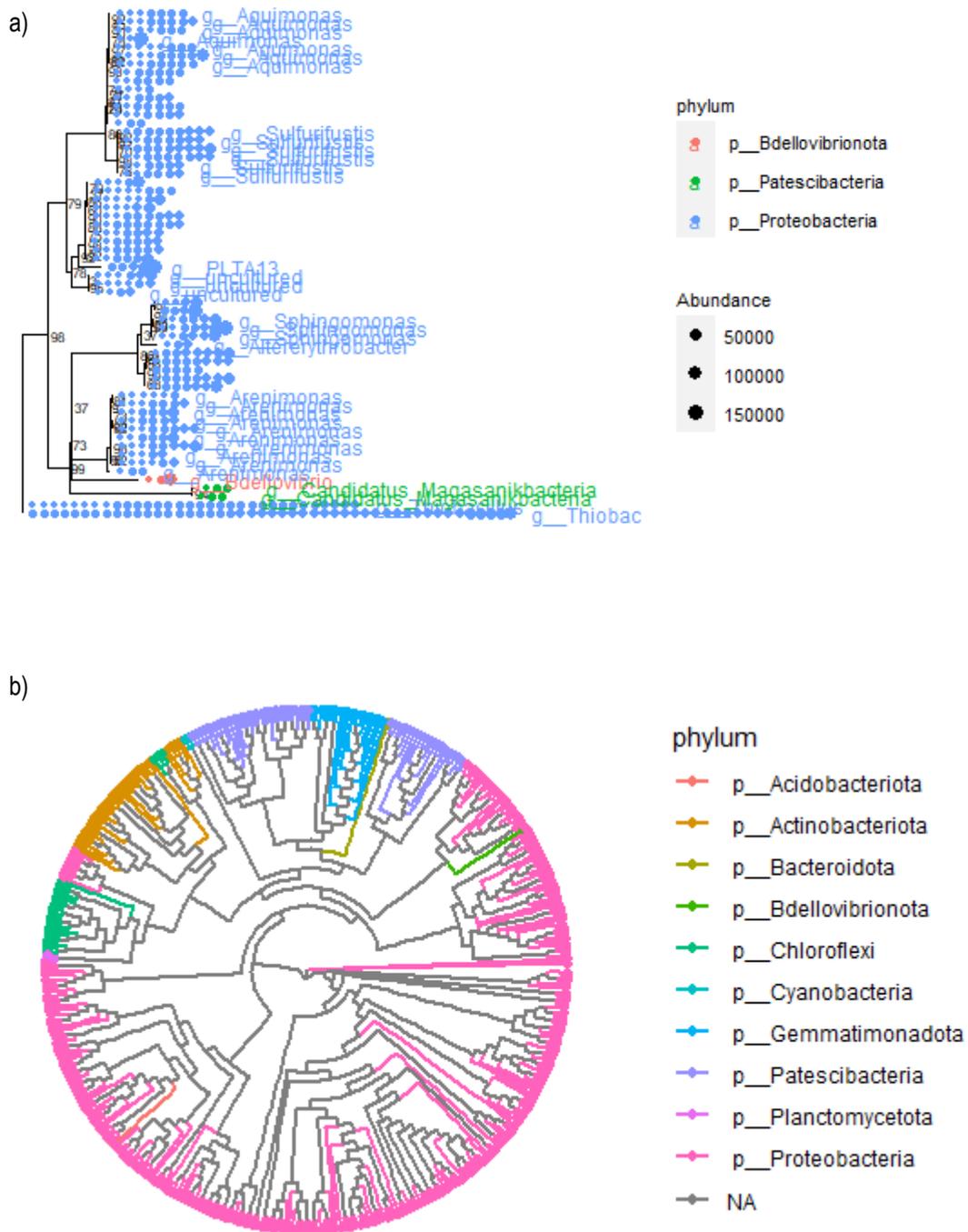


Figure 11 Arbre phylogénétique des bactéries avec a) les 50 taxons dominants ou b) les taxons dominants (présents dans au moins 10% des échantillons)

Tableau 10 Processus de nettoyage des séquences 16s avec QIIME2, nombre de séquences restantes après chaque étape de filtration par échantillon

Nom de l'échantillon	Nb de séquences brutes	Nb de séquences après la filtration basée sur la qualité	Nb de séquences après avoir enlevé les nucléotides non-biologiques	Nb de séquences alignées	Nb de séquences restantes non-chimériques
B01	141349	115822	115822	106396	24862
B02*	204	40	40	0	0
B03	97378	73846	73846	39929	7790
B04	75490	58012	58012	39471	4719
B05	106881	82150	82150	41180	10341
B06	68197	50904	50904	13063	6554
B07	54382	39527	39527	25143	2905
B08	63037	44462	44462	12974	8528
B09	55320	42677	42677	28552	3921
B10	101634	77895	77895	42759	6412
B11	64592	48713	48713	28039	4969
B12	89598	35087	35087	22529	4541
B13	73275	55112	55112	44196	3203
B14	48104	34208	34208	18508	2623
B15	73952	54188	54188	27948	5090
B16	76022	50237	50237	13609	7365
B17	65970	37294	37294	10076	4061
B18	74797	37549	37549	11382	3666
B19*	58735	30954	30954	13570	2717
B20	505067	345569	345569	123292	42728
B21	106988	75680	75680	55691	12498
B22	74106	33615	33615	18401	2009
B23	63764	36549	36549	21421	2708
B24	61797	29446	29446	10533	2661
B25	69765	47240	47240	27606	4145
B26*	7238	4035	4035	2612	472
B27	53813	39652	39652	18492	3701
B28	66729	46248	46248	23350	3251
B29*	224	35	35	35	35
B30	37234	18560	18560	7028	1793
B31	66143	45462	45462	30057	3041
B32	69087	51177	51177	35513	3710
B33	44974	31323	31323	22593	2796
B34	63378	47334	47334	40358	6882
B35	75088	51007	51007	39531	2701

B36	83718	52656	52656	36178	3757
B37*	4869	3454	3454	718	530
B38	10776	8102	8102	3933	951
B39	79335	52035	52035	23769	6591
B40	9428	6887	6887	4511	780
B41	10748	8419	8419	5092	1066
B42*	2202	1778	1778	1129	459
B43	12344	9675	9675	5776	1257
B44	61044	36467	36467	12516	5411
B45	62161	47875	47875	25344	4818
B46	11873	9282	9282	6237	1495
B47	18592	13543	13543	4098	2080
B48	76330	54112	54112	16881	6943
BT1	84053	62330	62330	14401	7459
BT2	90615	66082	66082	26516	5811
BT3	85290	65157	65157	31944	13120
TB	106009	75686	75686	69699	6618

* Ces échantillons ont été soustraits pour les analyses subséquentes,

Tableau 11 Processus de nettoyage des séquences ITS avec QIIME2, nombre de séquences restantes après chaque étape de filtration par échantillon

Nom de l'échantillon	Nb de séquences brutes	Nb de séquences après la filtration basée sur la qualité	Nb de séquences après avoir enlevé les nucléotides non-biologiques	Nb de séquences restantes non-chimériques
F1	23761	6838	6838	4436
F10	69525	8758	8758	8087
F11	112087	791	791	791
F12*	9188	55	55	0
F13	10331	422	422	422
F14	66702	41793	41793	26267
F15	73253	44049	44049	24594
F16	74573	41122	41122	30433
F17	68887	46358	46358	28874
F18	88463	75738	75738	47482
F19	92305	78657	78657	46778
F2*	32482	5006	5006	3810
F20	42313	11521	11521	8672
F21	75789	65594	65594	44110

F22	48901	32827	32827	16432
F23	136750	99228	99228	71426
F24	77784	69130	69130	52007
F25	79142	60714	60714	34426
F26	90230	78197	78197	45959
F27	25730	6184	6184	4793
F28	30934	8799	8799	4554
F29	77845	45192	45192	30819
F3	20327	3850	3850	2257
F30	65338	38039	38039	21423
F31	70447	57285	57285	40756
F32	71735	63069	63069	37178
F33	65335	57938	57938	37374
F34	66030	54000	54000	29444
F35	1765	757	757	680
F36	64749	51148	51148	37424
F37	52412	43440	43440	26130
F38	66516	52963	52963	27566
F39	642796	508997	508997	263213
F4	42642	7442	7442	4912
F40	64308	54197	54197	33590
F41	61866	51926	51926	30168
F42	188748	160099	160099	104689
F43	74304	64742	64742	40993
F44	86933	64338	64338	39439
F45	54341	26901	26901	19932
F46	47809	17584	17584	12433
F47	87202	65832	65832	49667
F48	143804	122006	122006	82642
F5	33987	4863	4863	2878
F6	83560	48921	48921	30390
F7	31522	5704	5704	4340
F8	54265	28834	28834	20170
F9	77301	66254	66254	51257
FT1	67067	60949	60949	48983
FT2	78747	65055	65055	53839
FT3*	146	40	40	40
TF*	103471	47	47	47

* Ces échantillons ont été soustraits pour les analyses subséquentes,