

***École Doctorale Energie, Matériaux, Sciences de la Terre et
de L'univers***

Institut des Sciences de la Terre d'Orléans

THÈSE présentée par :
Bashar Hussein QASIM

Soutenue publiquement le **17 Novembre 2015**
Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/Spécialité: Chimie Analytique

**Détermination, spéciation et biodisponibilité des
éléments traces métalliques dans les sols
contaminés et technosols**

THÈSE dirigée par :

Mikael MOTELICA-HEINO
Domenico MORABITO

Professeur, Université d'Orléans– Directeur de thèse
Maître de conférences, Université d'Orléans-Co-encadrant

RAPPORTEURS :

Camille DUMAT
Philippe Le COUSTUMER

Professeur de l'INP-ENSAT, Toulouse
Maître de conférences HDR, Université de Bordeaux

JURY :

Mikael MOTELICA-HEINO
Camille DUMAT
Arnaud GAUTHIER
Philippe Le COUSTUMER
Domenico MORABITO
Marilyne SOUBRAND

Professeur, Université d'Orléans – Directeur de thèse
Professeur de l'INP-ENSAT, Toulouse
Professeur, Université de Lille1
Maître de conférences HDR, Université de Bordeaux
Maître de conférences, Université d'Orléans-Co-encadrant
Maître de Conférences, Université de Limoges

***Doctorale School for Energy, Materials, Earth and Univers
Sciences***

Institute of Earth Sciences of Orleans

THESIS presented by:

Bashar Hussein QASIM

Date of thesis defence: **17th Novembre 2015**

In partial fulfillment of the requirement for the degree:

Doctor of Philosophy from the University of Orleans

Discipline/Speciality: Analytical Chemistry

**Determination, speciation and bioavailability
study of trace metals in contaminated soils and
technosoils**

THESIS directed by:

Mikael MOTELICA-HEINO
Domenico MORABITO

Professor, University of Orleans- Supervisor
Associate Professor, University of Orleans- Cosupervisor

RAPPORTEURS :

Camille DUMAT
Philippe Le COUSTUMER

Professor of l'INP- ENSAT, Toulouse
Associate Professor HDR, University of Bordeaux

JURY:

Mikael MOTELICA-HEINO
Camille DUMAT
Arnaud GAUTHIER
Philippe Le COUSTUMER
Domenico MORABITO
Marilyne SOUBRAND

Professor, University of Orleans - Supervisor
Professor, INP- ENSAT, Toulouse
Professor, University of Lille1
Associate Professor HDR, University of Bordeaux
Associate Professor, University of Orleans- Cosupervisor
Associate Professor, University of Limoges

Remerciements

Je présente tous mes remerciements tout d'abord à mon seigneur "**Allah**" qui m'a aidé à réaliser mon objectif et à compléter ce travail de recherche.

Je présente aussi mes remerciements à mon directeur de thèse, **Mikael MOTELICA-HEINO**, pour m'avoir intégré dans son équipe, pour ses conseils, ses commentaires de construction et pour m'avoir suivi et dirigé tout au long de ces trois ans. J'associe à ces remerciements **Domenico MORABITO**, pour m'avoir encadré dans ce travail et pour les nombreuses discussions, ses conseils et son aide lors de la réalisation des graphiques et des analyses statistiques.

Je tiens à remercier les rapporteurs, Madame Camille DUMAT et Monsieur Philippe Le COUSTUMER, ainsi que les membres du jury pour leurs commentaires scientifiques et leurs recommandations qui ont renforcé ce travail.

Ma reconnaissance s'adresse également aux partenaires ayant participé directement à ce travail: Sylvain BOURGERIE, Emmanuel JOUSSEIN, Marilyne SOUBRAND et Arnaud GAUTHIER pour m'avoir aidé lors des différentes expérimentations et lors du traitement des données.

Je tiens également à remercier le Directeur de l'Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, Monsieur Bruno Scaillet, et Madame la Directrice-adjointe Fatima Laggoun-Défarge qui m'ont accueilli au sein de l'ISTO.

Je présente mes remerciements et ma reconnaissance au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique d'Irak ainsi que l'Université de Technologie de Bagdad (Irak) pour le soutien financier à la réalisation de ce doctorat à l'Université d'Orléans (France).

Un grand merci enfin à tous les membres de la grande famille ISTO/CNRS et à mes camarades qui ont permis que ces trois années se déroulent dans la bonne humeur et ont

contribué par nos discussions à la réussite de ce travail et à la mise en place de liens d'amitié, alors, merci à Nour, Ridah, Régis, Guillaume, Annick, Simon, Mohamed, Lionel, Hugo, Kévin, Simona, Alex, Valentin, Romain, Maxime, Armel, Vincent, Aurélien, Lesli, Isabelle, Christian, Marielle, Jeremy, Myriam, Julie, Adoum, Léo, Nolwenn, Leïla, Eric, Emelie, Stanislas, Yan Chen, Pascale, Lydie, Renata, Laurent, Rachel, Yannick, Giada, Fabrice, Claude, Olivier, Luc, Patrick.

Je voudrais remercier également le personnel « administratif » (Marie-Noëlle, Nathalie, Chantal, Fabienne, Olivier, Virginie, Martine et Marlène).

Je remercie également tous mes collègues de la grande famille de la branche Chimie Appliquée de l'Université de Technologie de Bagdad sans oublier le Directeur et tous les employés du Département des Sciences Appliquées.

Je remercie affectueusement ma famille, **mon Père** et **ma Mère** qui ont pris soin de moi toute ma vie, et je demande à Dieu d'avoir pitié d'eux. Je n'oublie pas, mes frères et mes sœurs qui m'ont soutenu pendant ce travail, sans oublier ma belle-sœur Zeena pour son aide et sa générosité.

Enfin et surtout, je veux présenter mes sincères remerciements à **ma Femme**, pour ses soins, son soutien, son amour et ses encouragements pendant toute la durée de cette thèse.

BASHAR
2015

Table des matières

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE	1
1. Contexte scientifique	1
2. Les objectifs et la structure de la thèse	4
 <u>CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique</u>	 7
1. Les éléments traces métalliques dans les sols contaminés	9
1.1. Définition des éléments traces métalliques	9
2. Les origines des éléments traces métalliques dans le sol	10
2.1. Origine naturelle	10
2.2. L'origine anthropique	11
2.2.1. Les activités industrielles	11
2.2.2. Les activités minières	11
3. Le comportement des éléments traces métalliques dans le sol	11
3.1. Spéciation	11
3.2. Mobilité	12
3.3. Biodisponibilité	12
4. Les différentes techniques de mesure de la spéciation, mobilité et biodisponibilité des éléments traces métalliques	13
4.1. Les méthodes instrumentales	13
4.2. Les méthodes chimiques	14
4.2.1. Extraction simple (sélective)	14
4.2.1.1. L'eau déionisée	14
4.2.1.2. Solutions salines	15
4.2.1.3. Acides dilués	15
4.2.1.4. Complexants organiques	16

4.2.2. Extraction séquentielle	16
4.2.2.1. La fraction échangeable	16
4.2.2.2. La fraction associée aux carbonates	17
4.2.2.3. La fraction réductible	17
4.2.2.4. La fraction oxydable	17
4.2.2.5. La fraction résiduelle	17
4.3. Limite des schémas d'extractions séquentielles	18
4.4. L'eau interstitielle du sol	19
4.4.1. Définition	19
4.4.2. Biodisponibilité et l'eau interstitielle du sol	20
4.5. La technique du gradient diffusif en couche mince (DGT)	21
4.5.1. Labilité des espèces mesurées par la technique DGT	23
5. Effet des propriétés physico-chimiques et rhizosphérique sur le comportement des éléments traces métalliques dans les sols	25
5.1. Le pH	25
5.2. Le potentiel redox	26
5.3. Température du sol	27
5.4. Effet de l'environnement rhizosphérique	28
5.4.1. Acidification/alkalinisation	29
5.4.2. Exudation	29
6. L'interaction des ETM avec les constituants du sol	30
6.1 Adsorption	31
6.1.1. Adsorption non spécifique (physisorption)	31
6.1.2. Adsorption spécifique (chimisorption).....	32
6.2. Précipitation et co-précipitation	32
6.3. Complexation	33
6.4. Fixation par la matière organique	33
7. Présentation des éléments traces métalliques considérés dans cette étude	34
7.1. Le zinc (Zn)	34
7.2. Le plomb (Pb)	35
7.3. Le cadmium (Cd)	36
7.4. L'arsenic (As)	37
7.5. L'antimoine (Sb)	38
8. Utilisation de <i>Populus euramericana</i> génotype Dorskamp en phytoremédiation	39

CHAPITRE 2: Les méthodes instrumentales utilisées dans la présente étude pour quantifier les éléments traces métalliques 43

1. Introduction	45
1.1. Spectrométrie de Fluorescence X (XRF).....	45
1.1.1. Principe de la technique	46
1.1.2. Les composants de la spectrométrie XRF	47
1.1.3. Forces et limites de la spectrométrie XRF	48
1.2. La spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS).....	48
1.2.1. Les composants d'ICP-MS	48
1.2.1.1. ICP	49
1.2.1.2. Interface d'échantillonnage	49
1.2.1.3. Optique ionique	50
1.2.1.4. Spectromètre de masse	50
1.2.1.5. Détecteur d'ion	50
1.2.2. Force et la faiblesse de l'ICP-MS	50
1.3. Optimisation de la digestion micro-ondes	51
1.4. Les Sources principales d'incertitude dans l'analyse des éléments traces métalliques de l'environnement	52
1.4.1. La collecte et le stockage des échantillons	52
1.4.2. Préparation de l'échantillon	53
2. Les sites d'étude	55

CHAPITRE 3 : Spéciation, mobilité et phytodisponibilité des éléments traces métalliques 59

Chapitre 3.1 : Fractionnement des éléments potentiellement toxiques dans les technosols à l'aide de deux techniques d'extraction séquentielle 63

Résumé de l'article 1 (<i>Publié dans : Journal of Environmental Science and Pollution Research</i>).....	65
Article 1: Potentially toxic elements fractionation in technosols using two sequential extraction schemes	67

Abstract	67
1. Introduction	68
2. Materials and methods	70
2.1. Soil sampling	70
2.2. Reagents and standards	70
2.3. Analysis of the soil physico-chemical properties	71
2.4. X-ray fluorescence spectrometer (XRF).....	71
2.5. Soil mineralogical characterization	71
2.6. Sequential extractions	71
3. Results and discussion	73
3.1. Physico-chemical properties of the studied soils	73
3.2. Soil mineralogical composition	74
3.3. Fractionation of the PTE	74
3.3.1. MDN site	74
<i>Zinc</i>	74
<i>Lead</i>	75
<i>Cadmium</i>	76
3.3.2. LPF site	77
<i>Arsenic</i>	77
<i>Antimony</i>	78
<i>Lead</i>	79
3.4. Potential mobility of PTE in the technosols	84
4. Conclusion	87

**Chapitre 3.2: Évaluation de la phytodisponibilité des éléments
potentiellement toxiques dans les technosols d’anciennes zones minières et
industrielles 97**

Résumé de l’article 2 (<i>Publié dans : Journal of Environmental Science and Pollution Research</i>).....	99
Article 2: Potentially toxic elements phytoavailability assessment in technosols from former smelting and mining areas	101
Abstract	101
1. Introduction	102

2. Materials and methods	104
2.1. Soil sampling	104
2.2. Reagents and standards	105
2.3. Aqua regia/hydrofluoric acid digestion	105
2.4. Single extraction method	105
2.5. Germination tests	106
2.6. Plant analysis	107
2.7. Statistical analysis	107
3. Results and discussion	108
3.1. Physico-chemical properties of the studied soils	108
3.2. PTE extractability	109
3.3. Evaluation of single extraction efficiency	114
3.4. PTE bioavailability	115
3.5. Correlation of soil single extraction and bioavailability	118
4. Conclusion	121

Chapitre 3.3 : Utilisation de gradients diffusifs en couches minces, l'eau interstitielle du sol et plantes indicatrices afin de prédire la phytodisponibilité d'éléments potentiellement toxiques dans des technosols contaminés..... 131

Résumé de l'article 3 (<i>Accepté dans : Journal of Environmental Science and Pollution Research</i>).....	133
Article 3: Diffusive gradients in thin films, soil solutions and indicator plants to predict the bioavailabilities of potentially toxic elements in contaminated technosols	135
Abstract	135
1. Introduction	136
2. Materials and methods	138
2.1. Soil sampling	138
2.2. Soil total PTE analysis	139
2.3. Germination test and plant analysis	139
2.4. Soil pore water sampling	140
2.5. DGT deployment	141
2.6. Reagents and standards	142

2.7. Statistical analysis	143
3. Results and discussion	143
3.1. Soil properties	143
3.2. Physico-chemical analysis of the SPW	143
3.3. Concentrations of PTE in SPW and as measured by DGT	145
3.4. PTE phytoavailability	150
3.5. Correlation between PTE concentrations in soil solution, as measured by DGT devices and PTE accumulated in plant leaves	151
4. Conclusion	155

CHAPITRE 4 : Effets rhizosphériques sur la mobilité des éléments traces métalliques 163

Chapitre 4.1 : Effets rhizosphériques du *Populus euramericana* Dorskamp sur la mobilité du Zn, Pb et Cd dans les technosols contaminés 167

Résumé de l'article 4 (<i>Accepté dans: Journal of Soils and Sediments</i>)	169
Article 4: Rhizospheric effects of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp on the mobility of Zn, Pb and Cd in contaminated technosols	171
Abstract	171
1. Introduction	172
2. Materials and methods	174
2.1. Soil sampling	174
2.2. Soil physico-chemical properties	174
2.3. Reagents and standards	175
2.4. Rhizobox and cultivation experiment	175
2.5. Soil pore water collection and analysis	176
2.6. Statistical analysis	176
3. Results and discussion	176
3.1. Studied soil properties	176
3.2. Soil pore water pH and DOC concentrations	177
3.3. Zn, Pb and Cd concentrations in rhizosphere soils	179
3.4. Plant growth and metals uptake	182
4. Conclusion	185

Chapitre 4.2 : Effet de la fertilisation en azote (sous forme de nitrate et d'ammonium) sur la phytostabilisation du Zn, Pb et Cd par la *Populus euramericana* Dorskamp dans les technosols contaminés 193

Résumé de l'article 5 (Publié dans : *Journal of Environmental Science and Pollution Research*)..... 195

Article 5: Effect of nitrate and ammonium fertilization on Zn, Pb and Cd phytostabilization by *Populus euramericana* Dorskamp in contaminated technosol..... 197

Abstract 197

1. Introduction 198

2. Materials and methods 200

 2.1. Soil sampling 200

 2.2. Experimental design and plant analysis 200

 2.3. Soil solution collection and analysis 201

 2.4. Statistical analysis 201

3. Results and discussion 202

 3.1. Rhizospheric soil solution pH and dissolved organic carbon concentration 202

 3.2. Zn, Pb and Cd concentrations in rhizospheric SPW 206

 3.3. Plant growth and uptake of Zn, Cd and Pb 211

4. Conclusion 216

Conclusion générale et Perspectives 225

1. Conclusions générale 227

2. Perspectives 232

Références bibliographiques 237

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 : Sources, transferts, impacts et risques des éléments traces sur l'environnement.	10
Figure 1.2 : Cycle biogéochimique des contaminants du sol: la phase liquide du sol agit comme un régulateur du devenir des contaminants.....	19
Figure 1.3 : Représentation schématique des états de l'eau du sol et leurs définitions.....	20
Figure 1.4 : Illustration du dispositif expérimental utilisé pour la technique DGT dans le milieu aquatique.....	22
Figure 1.5 : Représentation schématique du gradient de concentration dans un DGT en contact avec l'eau interstitielle du sol dans le cas où le relargage de la phase solide est rapide, lente et inexistante.....	24
Figure 1.6 : Fraction de métaux adsorbés (cations et anions) sur une surface d'hydroxyde de fer (III) en fonction du pH.....	26
Figure 1.7 : Domaine de potentiel d'oxydoréduction.....	27
Figure 1.8 : Diagramme schématique montrant simplifiée les flux d'exsudation, de sorption, d'assimilation et de minéralisation des exsudats racinaires dans la solution du sol.....	30
Figure 1.9 : Différentes formes et mécanismes de la rétention des ETM dans le sol.....	31
Figure 1.10 : Représentation schématique de deux types de complexation de surface: complexe de sphère interne et complexe de sphère externe et de la précipitation de surface.....	33

Chapitre 2

Figure 2.1 : Principe et les composants de la spectroscopie par fluorescence X.....	47
Figure 2.2 : Les principales composantes du système ICP-MS.....	49
Figure 2.3 : Localisation et plan descriptif du site de Mortagne-du-Nord montrant les différents lieux d'échantillonnage des sols étudiés.....	55
Figure 2.4 : Localisation et plan descriptif du site de La Petite Faye montrant les différents lieux d'échantillonnage des sols étudiés.....	56

Chapitre 3.1

Figure 3.1.1: Chemical distribution of Zn, Pb, Cd, As and Sb in the different soil fractions in MDN and LPF (Tessier's scheme).....	80
Figure 3.1.2: Chemical distribution of Zn, Pb, Cd, As and Sb in the different soil fractions in MDN and LPF (modified BCR scheme).....	81
Figure 3.1.3: Potential mobility of the potentially toxic elements from the MDN site.....	86
Figure 3.1.4: Potential mobility of the potentially toxic elements from the LPF site.....	86

Chapitre 3.2

Figure 3.2.1: Extractable potentially toxic elements (Zn, Cd, Pb, As and Sb) (%) by various single extractants (CaCl ₂ , NaNO ₃ , NH ₄ NO ₃ , EDTA and DTPA) for MDN site and LPF site.....	113
Figure 3.2.2: Mineral masses of Zn, Pb, Cd, As and Sb (mg/plant) in the dwarf bean primary leaves for MDN site and LPF site.....	117

Chapitre 3.3

Figure 3.3.1: DGT measured concentration, and concentration in the soil solution for studied PTE in both MDN and LPF samples.....	149
--	-----

Chapitre 4.1

Figure 4.1.1: pH in the bulk soil solution and in the rhizosphere soil solution of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days.....	179
Figure 4.1.2: DOC concentrations in the bulk soil solution and in the rhizosphere soil solution of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days.....	179
Figure 4.1.3: Total dissolved concentrations of Zn, Cd and Pb in the bulk soil solution and in the the rhizosphere soil solution of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days.....	181
Figure 4.1.4: Biomass (dry weighth) of the different plant organs (leaves, stems and roots) of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days.....	184

Figure 4.1.5: Concentrations of Zn, Cd and Pb in the different organs (leaves, stems, cuttings and roots) of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days.....	165
--	-----

Chapitre 4.2

Figure 4.2.1: Effects of nitrogen nutrition on rhizospheric pH of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1, MDN2 and MDN3, during 35 days.....	204
Figure 4.2.2: Effects of nitrogen nutrition on rhizospheric DOC concentrations of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1, MDN2 and MDN3 during 35 days.....	205
Figure 4.2.3: Effects of nitrogen nutrition on Zn soil pore water of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1, MDN2 and MDN3 during 35 days.....	207
Figure 4.2.4: Effects of nitrogen nutrition on Pb soil pore water of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1, MDN2 and MDN3 during 35 days.....	208
Figure 4.2.5: Effects of nitrogen nutrition on Cd soil pore water of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1, MDN2 and MDN3 during 35 days.....	209
Figure 4.2.6: Effects of nitrogen nutrition on dry weights of leaves, stems and roots of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 35 days.....	212
Figure 4.2.7: Effects of nitrogen nutrition on Zn concentrations in leaves, cuttings, roots and stems of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 35 days.....	213
Figure 4.2.8: Effects of nitrogen nutrition on Pb concentrations in leaves, cuttings and roots of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 35 days.....	215
Figure 4.2.9: Effects of nitrogen nutrition on Cd concentrations in leaves, cuttings and roots of <i>Populus euramericana</i> Dorskamp grown in a contaminated technosol during 35 days.....	216

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 : Exemples de solutions d'extraction utilisées pour estimer la biodisponibilité des éléments traces métalliques dans lesol.....	14
--	----

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Comparaison des techniques d'analyse élémentaire.....	51
--	----

Chapitre 3.1

Tableau 3.1.1: Extraction conditions of the Tessier's scheme.....	72
Tableau 3.1.2: Extraction conditions of the modified BCR scheme.....	72
Tableau 3.1.3: Physico-chemical characteristics of the soils and PTE total concentrations of the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) and La Petite Faye (LPF).....	73
Tableau 3.1.4: Potentially toxic elements fractionation in the different solid phases as obtained from the Tessier's scheme.....	82
Tableau 3.1.5: Potentially toxic elements fractionation in the different solid phases as obtained from the modified BCR scheme.....	83

Chapitre 3.2

Tableau 3.2.1: Physico-chemical characteristics of the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) and La Petite Faye (LPF).....	108
Tableau 3.2.2: Pseudo total potentially toxic element content (mg.kg^{-1}) for the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) and La Petite Faye (LPF).....	109
Tableau 3.2.3: Extractable potentially toxic element content in the selected (MDN) samples (mg kg^{-1}).....	110
Tableau 3.2.4: Extractable potentially toxic element content in the selected (LPF) samples (mg kg^{-1}).....	111

Tableau 3.2.5: Total potentially toxic element content in primary bean leaves (DW) after 21 days in the selected (MDN) and (LPF) samples (mg kg ⁻¹ DW).....	118
Tableau 3.2.6: Pearson's correlation coefficients between potentially toxic element concentrations in primary bean leaves and their extractable concentrations by different single extraction procedures for MDN and LPF samples.	120
Tableau 3.2.7: Pearson's correlation coefficients between foliar potentially toxic element mineral mass and their extractable concentrations by different single extraction procedures for MDN and LPF samples.	121

Chapitre 3.3

Tableau 3.3.1: Physico-chemical characteristics of the selected soil samples from Mortagne-du-Nord (MDN) and La Petite Faye (LPF).....	144
Tableau 3.3.2: Soil pore water physicochemical parameters for the MDN and LPF sample.....	144
Tableau 3.3.3: Soil total metal concentration, total dissolved concentration of metal in the soil pore water, DGT measured concentration, concentration of metal in bean leaves, metal mineral mass and R-value for the MDN samples.....	147
Tableau 3.3.4: Soil total metal concentration, total dissolved concentration of metal in the soil pore water, DGT measured concentration, concentration of metal in bean leaves, metal mineral mass and R-value for the LPF samples.....	148
Tableau 3.3.5: Pearson's correlation coefficients between potentially toxic element indices: total dissolved concentration of metal in the soil pore water, DGT measured concentration, concentration of metal in plant leaves, metal mineral mass and soil total metal concentration in the MDN and LPF samples.....	154

Chapitre 4.1

Tableau 4.1.1: Physico-chemical characteristics of the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN).....	177
---	-----

Chapitre 4.2

Tableau 4.2.1: Physico-chemical characteristics of the selected samples from Mortagne-du-Nord(MDN).....	202
--	-----

Introduction générale

1. Contexte scientifique

La contamination et la pollution des sols par les éléments traces métalliques (ETM) constituent un des problèmes majeurs de notre époque. Les éléments traces métalliques sont présents naturellement à des concentrations variables dans les sols. Cependant les activités anthropiques conduisent à une augmentation de leurs concentrations dans les sols, formant ainsi des stocks de polluants potentiellement toxiques pour l'environnement. De plus ces stocks peuvent évoluer en fonction des conditions physico-chimiques du milieu et conditionner en grande partie leur toxicité vis-à-vis des organismes vivants.

Les sources principales anthropiques d'ETM dans les zones urbaines sont les activités industrielles, les activités minières, les transports, les pratiques agricoles, les boues des stations d'épuration et les composts urbains.

Les sources principales industrielles d'émissions atmosphériques d'ETM sont les usines d'incinération, la combustion du charbon et du pétrole (Robert et Juste, 1999).

Enfin, les sites miniers et de traitement des minerais sont souvent très fortement contaminés en ETM, entraînant des perturbations fortes de la pédofaune (Cole et al. 2001; Migliorini et al. 2005). Ces sites représentent une menace importante pour leur milieu environnant dans le cas d'une migration ou d'une diffusion des ETM. En particulier des quantités importantes d'ETM peuvent s'infiltrer dans le sous-sol et les nappes phréatiques ou ruisseler vers les terres cultivées.

Les termes pollution et contamination sont souvent employés confusément l'un pour l'autre. Le terme de « contamination » qualifie un apport d'éléments, issus de l'extérieur du site ; la conséquence en est une élévation de leur teneur originelle, sans indication sur leurs conséquences sur le comportement des organismes vivants présents sur ou à proximité du site. Le terme de « pollution » par contre, doit être réservé à une contamination qui engendre une perturbation du milieu, ou de l'usage normal qui en est fait habituellement (Bourrelrier & Berthelin, 1998). L'étude de la contamination de l'environnement a pour objectif de faire la part entre une présence naturelle et une présence d'origine anthropique et d'analyser comment cette contamination conduit à une toxicité pour les organismes vivants.

En effet, la connaissance de la forme physique et chimique des ETM, d'origine naturelle ou anthropique, est le facteur le plus important pour comprendre les mécanismes de transfert

dans un milieu et d'accumulation par les organismes vivants. Les interactions entre les ETM et le sol peuvent être étudiées en considérant les différents mécanismes et constituants du sol responsables de leur rétention. Cette démarche permet d'établir une répartition des ETM entre la phase solide et la phase liquide et donc d'évaluer leur mobilité et leur biodisponibilité dans le sol.

Parmi les éléments métalliques cités, certains sont des éléments essentiels comme le zinc (Zn), mais deviennent toxiques à de plus fortes concentrations. Le plomb (Pb) ou le cadmium (Cd) sont toxiques dès l'état de trace et n'ont pas de fonction biologique connue. L'accumulation de ces éléments et leur transfert constituent un risque pour les écosystèmes et la santé humaine *via* la contamination de la chaîne alimentaire. En effet les éléments majoritairement étudiés sont ceux qui ont des effets graves sur la santé humaine ou qui peuvent également causer des perturbations majeures sur les écosystèmes des sols (Alloway, 1995; Ross, 1994).

La concentration totale de contaminants métalliques dans le sol n'est pas une condition suffisante pour conduire ou pas à des effets toxiques vis-à-vis des organismes biologiques. En effet, la toxicité d'un métal ou d'un métalloïde n'est pas uniquement liée à sa concentration totale mais également à sa valence et aux ligands avec lesquels il est associé, c'est à dire à sa «spéciation ». La spéciation chimique est un paramètre fondamental qui contrôle la migration, la biodisponibilité et la toxicité des éléments chimiques dans les eaux, les sols et les sédiments. Ce paramètre résulte des interactions entre solutés, surfaces minérales, substances organiques et biologiques.

L'étude de la mobilité, du devenir et du transfert des ETM est très importante. La mobilité des ETM, aussi bien que leur biodisponibilité, dépend fortement de leur spéciation chimique dans les sols. La détermination exacte de la spéciation chimique est cependant souvent difficile (Quevauviller, 1997). Par conséquent, la détermination opérationnelle des formes plus larges, basées sur les extractions chimiques, se montre comme un bon compromis pour fournir des informations sur la spéciation des ETM dans les sols et donc sur le risque de contamination de l'environnement.

Les plantes, comme les invertébrés, réagissent de façon différente selon les espèces. Certaines sont peu ou pas tolérantes et meurent au contact des ETM. D'autres ont des réactions de défense, et freinent l'absorption en sécrétant des composés organiques qui vont augmenter le pH et par conséquent réduire la mobilité d'ertains ETM. D'autres enfin sont tolérantes aux ETM et les accumulent et les concentrent éventuellement. Ces plantes sont dites « hyperaccumulatrices ». Les ETM sont absorbés par les racines et y demeurent le plus souvent. Le passage dans les parties aériennes (tiges, feuilles) varient selon les éléments et

sont les signes d'un accroissement de leur concentration dans le sol (Prasad et Hagemeyer 1999).

L'interface entre les plantes et le sol est la rhizosphère. Le terme rhizosphère provient du grec et signifie l'influence des racines sur son milieu environnant. Il a été utilisé la première fois par *Hiltner* (1904) pour désigner la zone de sol où les exsudats libérés par les racines des plantes peuvent stimuler ou inhiber les activités des microorganismes du sol. Aujourd'hui le terme de rhizosphère est un concept plus général et est défini comme le volume de sol autour des plantes vivantes qui est influencé par les activités des racines (Darrah 1991; Hinsinger 1998).

Les conditions physico-chimiques et biologiques dans la rhizosphère sont entièrement différentes de celles dans le sol à une certaine distance de la racine c'est à dire le sol que l'on appelle « *sol total* ». Les racines agissent comme un puits de nutriments minéraux transportés à la surface de la racine par le débit massique et la diffusion. En outre, elles prennent des ions ou préférentiellement ce qui peut conduire à la déplétion ou à l'accumulation d'ions. Elles libèrent aussi des ions H^+ ou HCO_3^- et CO_2 qui modifient le pH et consomment ou libèrent de l' O_2 et ainsi provoquer des modifications du potentiel redox (Marschner 1995).

L'effet de l'exsudation racinaire sur la concentration en carbone organique dissout (COD) en solution rhizosphérique a reçu beaucoup d'attention. En effet, le COD joue un rôle important dans la biochimie du carbone, des nutriments et des ETM dans le sol en raison de la possible chélation avec les cations polyvalents, l'échange de cations et la solubilité des métaux (Stevenson 1994). Les anions organiques peuvent augmenter indirectement la concentration en COD par l'augmentation de l'activité microbienne et accroître ainsi, la mobilisation de la matière organique du sol par les microorganismes. Des concentrations élevées d'anions organiques peuvent mobiliser directement le COD des sols, probablement, par la complexation de Ca^+ qui peut stabiliser la matière organique dans le sol (Yang et al. 2001; Hauser et al. 2005).

L'analyse environnementale requiert des méthodes analytiques sensibles et sélectives pouvant opérer sur une grande gamme de concentrations pour déterminer la quantité d'ETM dans les milieux naturels mais aussi pour la caractérisation des milieux fortement contaminés. Une étude précise nécessite d'obtenir la détermination exacte de la forme chimique des polluants métalliques présents mais également la détermination de leurs concentrations totales.

La caractérisation des échantillons solides regroupe la caractérisation de la matrice, l'identification et la mesure d'éléments traces ou d'ultra-traces et l'identification des différentes formes chimiques des ETM. Les méthodes d'analyse du solide peuvent être

classées selon la technique instrumentale utilisée. Au niveau instrumental, on peut distinguer les techniques de spectrométrie atomique (spectrométrie d'émission ou d'absorption atomique, spectrométrie de masse) et les techniques d'analyse de solide.

Les techniques de spectrométrie d'absorption, d'émission atomique (GDAES, ICP-AES), de spectrométrie de masse (ICP-MS, GDMS, SIMS, SNMS, SSMS), ainsi que la spectroscopie et la microscopie électronique (ESCA, MEB-XEDS, la fluorescence X (XRF) et les techniques nucléaires (PIXE et activation neutronique) peuvent être utilisées pour l'analyse élémentaire du solide. La spectrométrie de masse à plasma inductif permet la mesure simultanée de presque tous les éléments de tableau périodique sur une grande gamme dynamique, des majeurs aux traces.

Enfin, pour l'analyse de la spéciation, la détermination directe de la forme chimique d'un analyte à l'état de trace dans une matrice solide n'est pas à priori envisageable mais les associations élémentaires et la partition dans les phases minéralogiques peuvent être déterminées.

2. Les objectifs et la structure de la thèse

Ce travail a pour objectif d'une part de déterminer les teneurs totales des éléments traces métalliques (ETM) tels que le zinc, le plomb, le cadmium, l'arsenic et l'antimoine, ainsi que leurs spéciations chimiques dans des technosols miniers et industriels, c'est-à-dire leurs répartition géochimique sur les différentes fractions constituant ces technosols, ainsi que leur biodisponibilité et leur remobilisation. D'autre part, il s'agit d'identifier les processus et de quantifier les paramètres physico-chimiques associés affectant la spéciation et le devenir de ces ETM dans les sols contaminés. Ceci permettra d'évaluer le risque de contamination et d'appréhender le danger pour l'environnement et l'homme. Enfin, il s'agit également d'étudier l'effet rhizosphérique sur la mobilité et la biodisponibilité de ces ETM.

Les différents ETM envisagés dans ce travail ont été sélectionnés en raison des propriétés toxiques qu'ils présentent pour la contamination et la pollution des sols agricoles. La division de la thèse et l'articulation des chapitres se feront en suivant les différentes échelles d'études, présentation des problématiques, démarche et apports scientifiques associés :

- **Le premier chapitre** présente une analyse bibliographique et quelques définitions et notions scientifiques sur les ETM. Il s'agit également de préciser leurs origines, leurs spéciations chimiques et les facteurs influençant leur mobilité et leurs

biodisponibilités, les mécanismes de fixation et de relargage dans les sols. Enfin, il s'agit aussi de préciser la définition de la rhizosphère et l'effet d'exsudats racinaires sur les propriétés physico-chimiques (pH, COD) du sol rhizosphérique et en conséquence l'effet de ces facteurs sur la mobilité et la disponibilité des ETM dans les sols étudiés.

- **Le deuxième chapitre** présente les méthodes instrumentales utilisées dans la présente étude pour quantifier les ETM ainsi que les principes généraux de la collecte, du stockage et de la préparation des échantillons du sol et de sa solution.
- **Le troisième chapitre** expose successivement les résultats obtenus pour chacune des problématiques relatives à l'étude du comportement des ETM dans les sols étudiés. Le **chapitre 3.1**, expose les résultats relatifs à la spéciation chimique des ETM étudiés dans les différentes fractions de ces technosols à l'aide de deux techniques d'extraction séquentielle (le schéma de Tessier et le schéma de BCR modifié). Les **chapitres 3.2 et 3.3** exposent les résultats relatifs à la prédiction de la biodisponibilité, mobilité et remobilisation dynamique des ETM étudiés en utilisant différentes procédures d'extraction simples (CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , EDTA et DTPA), l'eau interstitielle du sol et des gradients de diffusion dans des couches minces (DGT) pour étudier les fractions métalliques labiles et phytodisponibles.
- **Le quatrième chapitre** expose les résultats relatifs à l'étude de l'effet rhizosphérique de la plante *Populus euramericana* Dorskamp sur la mobilité des ETM étudiés dans les sols par rapport aux sols totaux (**Chapitre 4.1**), et ensuite, l'effet de l'ajout d'azote (sous forme de nitrate ou d'ammonium) sur la phytostabilisation des ETM étudiés (**Chapitre 4.2**).

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1. Les éléments traces métalliques dans les sols contaminés

1.1. Définition des éléments traces métalliques

Les éléments traces métalliques (ETM) présentent généralement une concentration inférieure à 0.1 %. Ils représentent ensemble seulement 0.6% du total de la croûte terrestre alors que les 12 éléments majeurs (Si, Al, Fe, Ca, Na, Mg, K, Ti, P, Mn, S et Ba) interviennent pour 99.4% (Alloway 1995; Baize 1997). Dans les écosystèmes terrestres, les ETM (métaux et métalloïdes) peuvent être classés en 3 catégories (Walker et al. 1996; Defaye et al. 1998) en fonction de leurs effets et de leurs réactions avec les composantes organiques et minérales du sol:

- i) Les éléments « essentiels » qui possèdent un rôle primordial pour le développement des végétaux et pour une bonne reproduction des organismes vivants.
- ii) Les éléments « non essentiels » qui sont toxiques à certaines concentrations et peuvent induire des déficiences en éléments essentiels, au travers de la compétition pour les sites actifs des molécules importantes dans la physiologie des organismes.
- iii) Les éléments « indifférents » qui ont un effet ni bénéfique ni indésirable.

La majorité des éléments traces métalliques présents dans les sols appartient à la famille chimique des métaux et métalloïdes et sont considérés comme toxiques pour l'homme et l'environnement, mais seulement une partie d'entre eux présente un intérêt écologique, biologique ou économique.

Le terme "métaux lourds" est aussi souvent appliqué indistinctement à des éléments ne répondant pas à l'ensemble de ces critères, en dépit de leur définition (masse volumique supérieure à 5g cm^{-3} , numéro atomique élevé et pouvant former des sulfures très peu solubles) (Adriano 1986). Les ETM sont présents dans les sols sous différents états, dans les phases solide et liquide. La quantité existante dans la solution du sol représente normalement un infime pourcentage de la concentration totale (Juste 1995). Les métaux se concentrent donc dans la phase solide du sol où ils se répartissent dans les différentes fractions organiques et minérales.

Pendant plusieurs siècles, les teneurs en métaux dans le milieu naturel ont peu varié mais avec le développement industriel, les activités humaines sont devenues une nouvelle source d'émission de métaux; ainsi, les concentrations dans l'air (Nriagu 1989), dans l'eau

(Stumm et Morgan, 1996) et dans les sols (Kabata-Pendias et Pendias 1992) représentent un important et dangereux risque de contamination de l'environnement (Fig. 1.1).

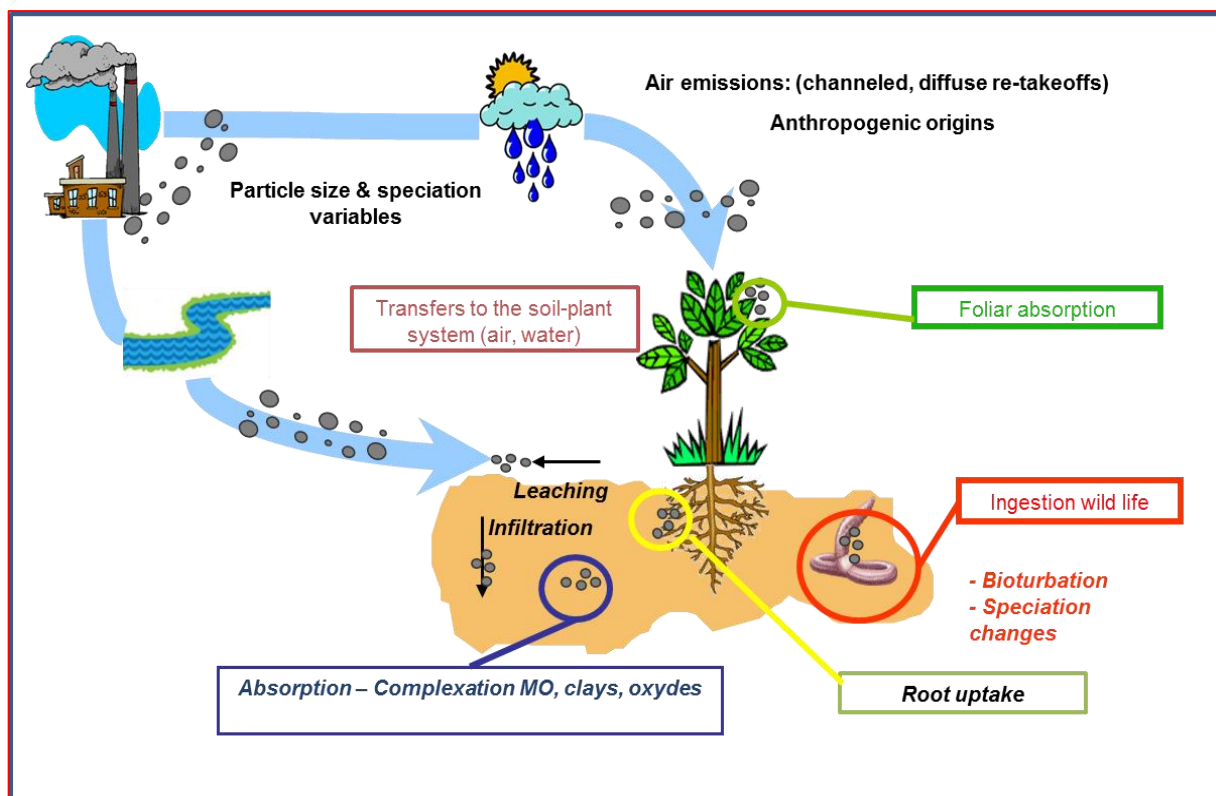


Figure 1.1: Sources, transferts, impacts et risques des éléments traces sur l'environnement (d'après Camille Dumas, communication personnelle)

2. Les origines des éléments traces métalliques dans le sol

2.1. Origine naturelle

Les ETM sont naturellement présents dans les sols en faibles quantités. Ils sont en partie libérés lors de l'altération de la roche mère (roches magmatiques, métamorphiques ou sédimentaires) par l'altération des minéraux primaires et secondaires comme les argiles, oxydes et carbonates. Ils constituent le pool endogène appelé fond pédogéochimique : concentration naturelle d'une substance dans un horizon de sol, résultant de l'évolution géologique et pédologique, à l'exclusion de tout apport d'origine anthropique (Alloway, 1995; Wenzel et al. 2003; Baize and Tercé 2002).

2.2. L'origine anthropique

2.2.1. Les activités industrielles

Les activités industrielles sont des sources importantes d'ETM, pour l'environnement en général et pour les écosystèmes terrestres en particulier. Les sources de contaminations industrielles sont la production de batteries ou d'accumulateurs, de matières plastiques, de vernis, de pigments, de produits phytosanitaires et d'engrais (Rieuwerts et al. 1999; Stepniewska et Bucior 2001).

Les rejets industriels, notamment composés de métaux lourds, sont les plus toxiques pour le sol même en faibles quantités et causent des problèmes de phytotoxicité et polluent les eaux souterraines.

2.2.2. Les activités minières

Avec la révolution industrielle, en particulier depuis le début du 20^{ème} siècle, l'exploitation des mines métallifères en vue de la production de produits manufacturés a augmenté de façon considérable les sources de pollutions (Nriagu, 1990; Douay et al. 2008).

La métallurgie (mines, fonderies) participe de façon importante à la contamination des sols *via* les rejets atmosphériques et le stockage des déchets (van Alphen 1999; Goodarzi et al. 2002).

3. Le comportement des éléments traces métalliques dans le sol

Les ETM sont liés à différents constituants du sol et sont présents sous différentes formes chimiques. Ils peuvent changer de forme (plus ou moins solubles) ou migrer vers d'autres constituants du sol ou vers la phase liquide selon les conditions physico-chimiques. Ces changements rendent les ETM plus ou moins mobiles dans les sols et plus ou moins disponibles pour la biosphère.

3.1 Spéciation

Le terme de spéciation a été utilisé dans la chimie des sols et des sédiments et désigne la forme chimique et structurale sous laquelle se trouve un élément métallique. La spéciation a été définie comme étant la détermination d'une forme spécifique (monoatomique ou moléculaire) ou bien la configuration selon laquelle un élément peut être présent dans un groupe d'atomes correspondant à différentes matrices (Hetland et al. 1991).

Dans l'environnement, les ETM se trouvent sous différentes formes chimiques et la mesure de la concentration totale de ces ETM ne suffit pas pour déterminer leur réactivité, mobilité, biodisponibilité et toxicité. Ces faits expliquent l'intérêt majeur qui est donné à la quantification de certaines formes chimiques biodisponibles ou très toxiques des ETM.

3.2. Mobilité

La mobilité d'un élément est caractérisée par son aptitude à passer dans les compartiments du sol où il est de moins en moins énergiquement retenu (Juste 1988; McLaughlin et al. 2000). Les ETM sont associés aux constituants du sol qui contrôlent leur mobilité. Ils peuvent être (Baize 1997):

- adsorbés sur les phases hydroxyde du fer, de l'aluminium et du manganèse,
- inclus dans les réseaux cristallins des minéraux primaires et des constituants secondaires,
- adsorbés sur les matières organiques,

La répartition des métaux et métalloïdes dans ces différents compartiments du sol et toutes les formes disponibles ne présentent pas forcément des risques environnementaux. Les variations des conditions physico-chimiques (pH, température, force ionique.... etc.) peuvent jouer directement sur la mobilité des éléments en faisant passer les métaux présents dans un sol d'une forme à une autre. Ce changement met donc en jeu des mécanismes biogéochimiques de mobilisation, d'immobilisation et de transport. Ces mécanismes dépendent de processus de dissolution/précipitation, désorption/adsorption et complexation qui font intervenir des réactions biologiques, chimiques et physico-chimiques (Bourrelrier et Berthelin 1998).

En effet, la mobilité et la biodisponibilité des ETM dépendent fortement de leur spéciation chimique dans les sols. Cependant la détermination exacte de la spéciation chimique est souvent difficile et dans la plupart des cas impossible (Quevauviller 1997).

3.3. Biodisponibilité

La biodisponibilité désigne la capacité d'une quantité d'un élément présent dans le sol à être absorbé par un organisme vivant (Newman and Jagoe 1994). La biodisponibilité est un outil d'évaluation de la toxicité et le risque de pollution. Le changement de la biodisponibilité d'un polluant correspond à un changement de toxicité. La quantité phytodisponible d'un élément dans un sol correspond aux ETM capables de passer en solution et d'être absorbés par

la plante. En effet, l'ion sous forme libre (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , ... etc.) est l'une des formes les plus réactives, avec les espèces neutres et la plus facilement assimilable par les organismes vivants.

Les risques liés aux ETM pour l'environnement et la santé humaine devront donc être évalués au travers leur spéciation, leur mobilité et leur biodisponibilité, qui sont les principaux facteurs conditionnant leur toxicité (Van Oort 2007).

4. Les différentes techniques de mesure de la spéciation, mobilité et biodisponibilité des ETM

Les méthodes d'analyses de la spéciation chimique, mobilité et biodisponibilité des ETM dans les sols peuvent être classées en deux groupes : les méthodes instrumentales et les méthodes chimiques. Les méthodes instrumentales permettent une caractérisation directe de l'échantillon solide tandis que les méthodes chimiques utilisent l'extraction simple (sélective) (Salomons et Forstner 1980; Lebourg 1996) et l'extraction séquentielle à partir de la matrice solide (Tessier et al. 1979), l'eau interstitielle du sol et la technique du gradient diffusif en couche mince (DGT) (Zhang and Davison, 1995).

4.1. Les méthodes instrumentales

Les méthodes d'analyse du solide peuvent être classées selon la technique instrumentale utilisée. Au niveau instrumental, on peut distinguer les techniques de spectrométrie atomique (spectrométrie d'émission ou d'absorption atomique, spectrométrie de masse) et les techniques d'analyse de solide.

Un aspect important des méthodes instrumentales d'analyse de solide est la possibilité d'analyse spatiale en plus de l'analyse élémentaire. Il faut distinguer l'analyse de surface, l'analyse localisée ou microanalyse et l'analyse en profondeur (profils). L'analyse de surface est possible avec certaines techniques de spectrométrie du solide (GDMS, SIMS, SNMS), de spectroscopie électronique (ESCA, spectroscopie Auger) et de fluorescence X (XRF).

Enfin, certaines techniques d'analyses du solide (ESCA, Xanes,...etc.) permettent également de caractériser la forme chimique des analytes et apportent une information sur l'environnement chimique d'un élément (Motelica-Heino 1999).

4.2. Les méthodes chimiques

4.2.1. Extraction simple (sélective)

La méthode d'extraction simple est employée dans les sciences du sol pour prédire la disponibilité des ETM pour les plantes. La détermination des teneurs en métaux et métalloïdes extractibles et facilement échangeables est effectuée par des extractions chimiques simples avec différents réactifs. Les extractants chimiques peuvent varier depuis des acides très forts, tel que l'acide nitrique ou l'acide chlorhydrique, à des solutions salines, comme le chlorure de calcium (Lebourg 1996) (Tableau 1.1).

Les conditions expérimentales mises en œuvre pour tester la valeur prédictive des solutions d'extraction sont particulièrement variées en ce qui concerne à la fois le protocole d'extraction chimique choisi, que les méthodes de culture suivies.

Tableau 1.1: Exemples de solutions d'extraction utilisées pour estimer la biodisponibilité des métaux dans le sol (d'après Harmsen, 2007)

Type d'extraction	Simule	Exemple
Eau	La concentration de l'eau interstitielle du sol	Rhizon échantillonneur, Centrifugation
Sel neutre	La concentration de l'eau interstitielle du sol	0.01 M CaCl_2 1 M NH_4NO_3 0.1 M NaNO_3
Acide	Potentiellement soluble dans l'eau	Acide fort dilué : 0.43 M HNO_3 Acide faible : 0.43 M acide acétique
Agent complexant	Potentiellement soluble dans l'eau	EDTA, DTPA

Quatre types de solutions d'extraction sont principalement utilisés : l'eau déionisée, les solutions salines, les acides dilués et les complexants organiques :

4.2.1.1. L'eau déionisée

La phase extraite par l'eau déionisée contient les métaux et métalloïdes les plus mobiles et potentiellement les plus disponibles. Par conséquent l'extraction par l'eau déionisée peut

être utilisée pour simuler les conditions naturelles du sol ; cependant les quantités extraites sont très faibles d'où une difficulté de dosage analytique (Ure 1996).

De plus, l'extraction à l'eau pose d'autres problèmes analytiques puisque elle ne permet pas une floculation adéquate de la suspension. Les résultats sont alors surestimés en raison de la présence dans le réactif de particules colloïdales en suspension porteuses de l'élément recherché. Cette fraction colloïdale du sol est d'ailleurs rarement prise en compte et constitue probablement un des sujets d'étude le moins exploré dans le cas des micro-polluants métalliques dans le sol.

4.2.1.2. Solutions salines

Les solutions salines utilisées sont principalement les chlorures de calcium, d'aluminium, puis les nitrates de sodium et d'ammonium. Leurs concentrations varient selon les méthodes de 0.01M à 1M. Le chlorure de calcium est largement utilisé pour évaluer la biodisponibilité du cadmium, du zinc et du nickel, grâce au fait que les ions calcium, fortement adsorbés par le complexe argilo-humique, déplacent aisément les ions fixés sur ce complexe (réaction d'échange) et en même temps modifient peu le pH lors de l'extraction (Pueyo et al. 2004; Meers et al. 2007b; Ettler et al. 2007b).

Enfin, Gupta et Aten (1993) ont montré que malgré des concentrations parfois proches des limites de détection, les quantités de cadmium, de zinc et de cuivre, extraites de sols pollués sont corrélées aux teneurs relevées dans les végétaux et sont proches de celles de la solution du sol.

4.2.1.3. Acides dilués

L'extraction par les acides dilués est également utilisée pour évaluer la biodisponibilité des éléments traces métalliques. Les acides employés sont le plus souvent l'acide acétique, l'acide chlorhydrique ou un mélange de divers acides à faible concentration.

Par exemple, un mélange d'acide chlorhydrique 0.05M et d'acide sulfurique 0.0125 M, nommé Melnich a été utilisé par Mulchi et al. (1992) et a permis d'observer une bonne corrélation entre les teneurs en cuivre, manganèse, nickel et cadmium des sols et les teneurs relevées dans des plants de tabac. L'acide nitrique à 0.5M a été utilisé par Tipping et al. (2003) pour l'extraction simple des métaux tels que Cu, Zn, Cd et Pb.

4.2.1.4. Complexants organiques

Les complexants organiques sont très puissants et sont couramment utilisés pour estimer non seulement la fraction échangeable des métaux, mais aussi la fraction complexée par la matière organique et la fraction fixée sur les hydroxydes de fer, de manganèse et d'aluminium. L'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) et le DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) sont les complexants principalement utilisés.

L'utilisation d'EDTA a été choisie selon la norme destinée à estimer la quantité des éléments traces métalliques biodisponibles dans le sol. Cependant, les quantités extraites se révèlent souvent élevées et peu corrélées aux teneurs réellement biodisponibles (Gupta et Aten 1993).

4.2.2. Extraction séquentielle

Tessier et al. (1979) étaient parmi les premiers à utiliser un schéma d'extraction séquentielle. Leur schéma comprend cinq étapes pour distinguer l'élément se trouvant sous la forme : échangeable, liée aux carbonates, liée aux oxydes, liée à la matière organique et enfin ceux correspondant à la fraction résiduelle. De nombreux auteurs (Förstner et al. 1981; Shuman 1985; Clevenger 1990) ont modifié ce protocole en modifiant le nombre d'étapes ou les réactifs utilisés. Le BCR (Bureau Communautaire de Référence) a lancé un programme pour harmoniser les protocoles d'extractions séquentielles. Il définit le fractionnement en quatre étapes : la fraction acido – soluble qui correspond à la fraction échangeable et liée aux carbonates; la fraction réductible (liée aux oxydes); la fraction oxydable (liée à la matière organique) et la fraction résiduelle.

Nous allons examiner chacune de ces fractions :

4.2.2.1. La fraction échangeable

Cette fraction représente la partie mobile et biodisponible d'ETM dans les sols (Gleyzes et al. 2002). Elle regroupe les métaux adsorbés non spécifiquement sur les particules et facilement mobilisables par échanges ioniques avec des cations tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} ou NH_4^+ , le contre-ion étant généralement Cl^- , CH_3COO^- et NO_3^- . Cette fraction est potentiellement la plus mobile et donc la plus toxique pour l'environnement si elle est associée par des forces électrostatiques non-spécifiques à des métaux.

4.2.2.2. La fraction associée aux carbonates

Cette fraction essentiellement composée de constituants carbonatés est sensible à une faible diminution de pH. Le mécanisme utilisé pour évaluer la quantité de métaux associés à cette fraction est la dissolution du matériau solide par des acides faibles à un pH= 5.

Les réactifs les plus largement utilisés sont l'acide acétique ou les acétates à un pH= 5, car la solution acide permet de dissoudre les carbonates et le pouvoir complexant de l'acétate empêche la réadsorption ou la reprécipitation des ions libérés (Tessier et al. 1979; Förstner et al. 1981).

4.2.2.3. La fraction réductible

Cette fraction contient les métaux associés aux oxydes de fer, d'aluminium et de manganèse. Le principe des protocoles expérimentaux est la réduction des oxydes qui a pour but la libération des métaux liés. Ces oxydes sont thermodynamiquement instables en condition anoxique (dissolution réductive) provoquée par exemple par une diminution du potentiel d'oxydoréduction (Tessier et al. 1979).

Les métaux et métalloïdes associés à cette fraction sont extraits par un agent réducteur et un autre réactif permettant de maintenir en solution les métaux solubilisés. Les réactifs les plus utilisés sont le chlorhydrate d'hydroxylamine, le tampon acide oxalique/oxalate et le dithionite - citrate de sodium.

4.2.2.4. La fraction oxydable

Les éléments métalliques extraits dans cette fraction sont considérés comme liés à la matière organique (particules, pellicule organique à la surface des particules). La liaison principale est la complexation. En milieu oxydant, les matières organiques sont dégradées et libèrent les métaux lourds (Tessier et al. 1979). Dans les schémas d'extractions sélectives, cette fraction est généralement obtenue par action d'eau oxygénée acidifiée sur l'échantillon, suivie d'une extraction à l'acétate d'ammonium pour maintenir en solution les métaux solubilisés.

4.2.2.5. La fraction résiduelle

La fraction résiduelle est essentiellement constituée de minéraux primaires et secondaires qui restent fixés après les étapes d'extraction (e.g. alumino-silicates). Pour

déterminer la quantité fixée dans cette fraction, la digestion par des acides forts tels que HF, HClO₄, HCl et HNO₃ est utilisée. La nature et le nombre d'acides varient suivant les auteurs. On considère que les métaux de cette fraction ne sont pas libérables dans les conditions naturelles (Tessier et al. 1979).

Cependant, de nombreux auteurs (Quevauviller 1997; Belzile et al. 1989) déterminent cette fraction par différence entre la quantité totale de métal (minéralisation du sol initial) et la somme des quantités extraites dans chaque fraction.

4.3. Limite des schémas d'extractions séquentielles

Les méthodes des extractions séquentielles sont largement utilisées mais elles sont en même temps beaucoup critiquées pour l'absence de procédure de référence et de contrôle de la qualité, de par la sélectivité des réactifs et la réadsorption potentielle des éléments ou de leur recombinaison au cours de différentes étapes de l'extraction (Cornu et Clozel 2000; Bermond, 1992). Bien que certains schémas d'extractions séquentielles aient été largement utilisés, aucun d'entre eux n'a été désigné comme procédure de référence. Le mode de préparation des échantillons, la diversité des réactifs, le nombre d'étapes d'extraction et leur succession dans les schémas disponibles rendent délicate la comparaison des résultats d'une étude à une autre (Kheboian et Bauer, 1987).

La sélectivité des solutions d'extraction a été également remise en question par des recherches sur des phases minérales synthétiques. En effet, l'attaque chimique d'une phase n'entraîne pas toujours une solubilisation totale des éléments contenus dans cette phase et peut avoir des conséquences sur la solubilisation des éléments présent dans d'autres phases de l'échantillon (Belzile et al. 1989; Hass et Fine 2010).

De plus les problèmes de réadsorption des métaux au cours des extractions ont été mis en évidence dans les sols. Les métaux relargués par minéralisation d'une phase peuvent se répartir sur les phases restantes (Kheboian et Bauer 1987). La dissolution incomplète de certaines phases, les changements de pH et la modification de l'équilibre peuvent conduire les éléments à se réadsorber sur certaines phases ou à précipiter sous de nouvelles formes. En conclusion, l'extraction séquentielle reste cependant à ce jour la seule approche chimique relativement simple de caractérisation des différentes formes d'un métal dans un sol malgré ces limites.

4.4. L'eau interstitielle du sol

4.4.1. Définition

La phase liquide du sol a une composition et une réactivité définies par les propriétés de l'eau entrante, les flux de matière et d'énergie provenant de la phase solide du sol, du système biologique et de l'atmosphère (Fig. 1.2).

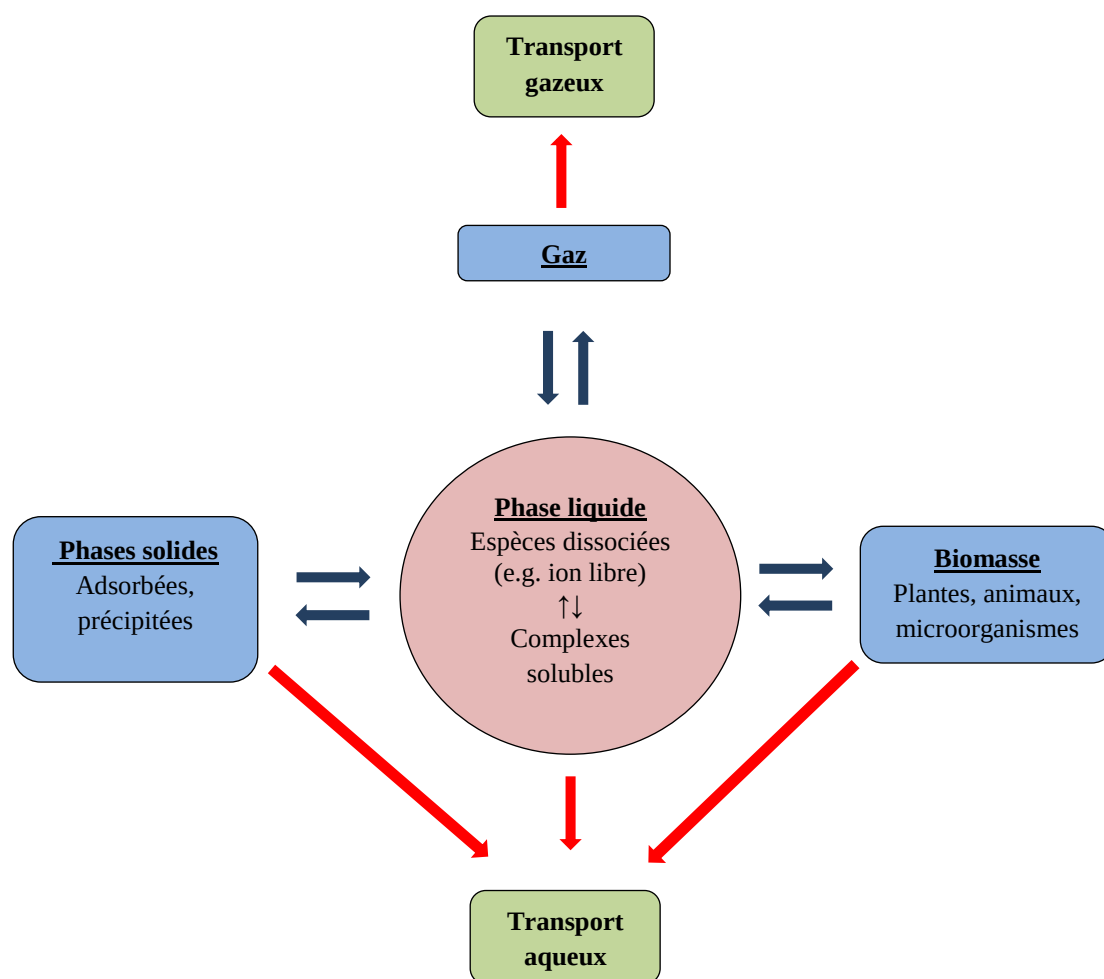


Figure 1.2: Cycle biogéochimique des contaminants dans le sol: la phase liquide du sol agit comme un régulateur du transfert des contaminants (Hesterberg, 1998, Lindsay, 1979; Mattigod et al. 1981).

Le point de vue actuel est que dans un milieu poreux, deux régions en phase liquide peuvent être identifiées pour des raisons fonctionnelles (Yaron et al. 1996). Le premier est à proximité de la phase solide et elle est considérée comme la plus importante zone de réaction de surface du système dans le milieu poreux. Cette eau près de la surface contrôle également

la diffusion de la fraction mobile du soluté en contact avec la phase solide. La deuxième région couvre la zone d'eau libre qui régit le débit d'eau et le transport de soluté dans les sols (Fig. 1.3).

Ces deux phases représentent ce qui peut être défini comme "l'eau interstitielle du sol". Ce terme est préférable à la terminologie plus spécifique de "solution du sol" et sera utilisé dans une grande partie de cette thèse.

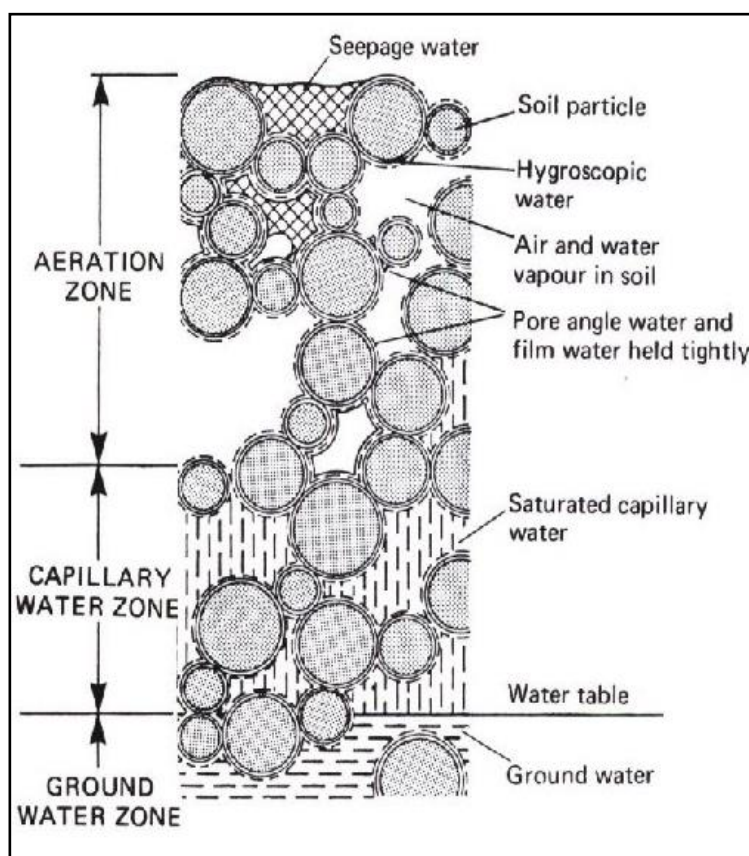


Figure 1.3: Représentation schématique des états de l'eau interstitielle du sol et leurs définitions (Shaw, 1993).

4.4.2. Biodisponibilité et composition de l'eau interstitielle du sol

L'analyse de la composition de l'eau interstitielle du sol est souvent plus instructive que celle du sol total (concentration totale) ou des extraits de sol pour évaluer la réactivité, la mobilité et la biodisponibilité des éléments traces dans le sol. La validité de ce concept a conduit au développement de plusieurs modèles qui tentent de prédire la répartition des éléments entre les différentes fractions solides du sol et leur spéciation de solution.

L'analyse de l'eau interstitielle du sol peut être utilisée pour modéliser la nature, l'étendue et le taux de réactions chimiques. Plusieurs méthodes sont disponibles pour l'échantillonnage et l'analyse de l'eau interstitielle du sol, en tenant compte de la spéciation des espèces chimiques et de la composition de l'eau interstitielle du sol. Malheureusement, aucune d'entre elles n'a été adoptée comme « procédure standard », conduisant à une situation assez confuse.

L'échantillonnage de l'eau interstitielle du sol présente souvent une ambiguïté conceptuelle ainsi que des problèmes techniques. En effet, la porosité du sol représente généralement un facteur limitant dans la définition du rapport entre les phases solides, aqueuses et gazeuses du sol (Yaron et al. 1996) en raison des limites ouvertes entre ces différentes phases conduisant à un processus changeant continu.

En outre les concentrations de solutés dans la solution du sol échantillonnée peuvent dépendre d'un certain nombre de facteurs techniques, comprenant :

- i) la méthode d'extraction,
- ii) la tension imposée,
- iii) le débit de l'échantillonneur,
- iv) la relation du volume du sol échantillonné par rapport à l'échelle de l'hétérogénéité de la concentration de soluté.

Les concentrations de solutés ont rarement été mesurées à travers une gamme de taille de pores et examinées en relation avec les propriétés physiques du sol telles que la distribution de taille des pores efficaces ou les caractéristiques de rétention d'eau du sol.

4.5. La technique du gradient diffusif en couche mince (DGT)

Dans les années 90, la technique du gradient diffusif en couche mince (*Diffusive Gradients in Thin films* (DGT)) a été développée par Davison et Zhang (Université de Lancaster, UK). Cette technique représente une nouvelle approche pour la détermination de l'ion métallique libre et de ses complexes labiles présents dans les eaux naturelles (Davison et al. 1994), les sédiments et les sols (Zhang et al. 1995; Osterlund et al. 2010). L'attrait pour cette technique tient à ce qu'elle est d'un usage particulièrement simple et s'utilise directement *in situ*, sans modification de l'échantillon, en intégrant la contamination dans le temps si celle-ci est variable.

Cette technique est basée sur les propriétés de diffusion des espèces métalliques dissoutes à travers un gel de diffusion (hydrogel) et d'accumulation sur une résine échangeuse

d'ions, type Chelex100TM. Le dispositif de DGT (Fig. 1.4) est composé d'un support plastique sur lequel s'imbriquent une résine échangeuse de cations, un gel de diffusion (polyacrylamide) d'épaisseur et de surfaces définies et un filtre de protection en membrane (0.45 µm). La résine est capable de fixer de manière irréversible les espèces métalliques; le gel diffusif est disposé devant la résine et permet de contrôler le flux de diffusion de l'ensemble des espèces dissoutes de la solution extérieure vers la résine fixatrice (Zhang and Davison 1999).

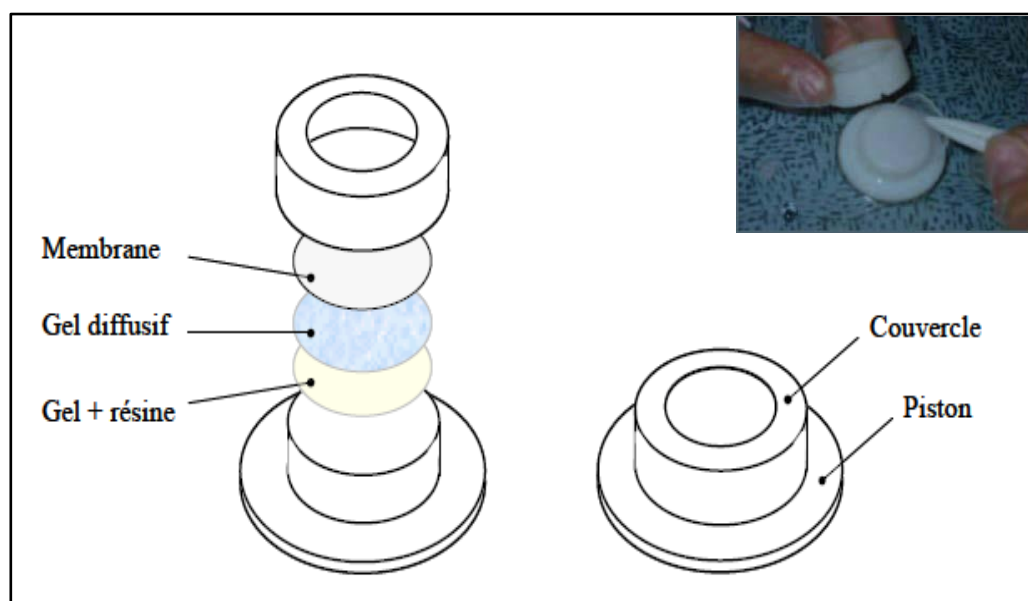


Figure 1.4: Illustration du dispositif expérimental utilisé pour la technique DGT (*d'après Gonzalez et al. 2009*).

La quantité M de métal s'accumule et est mesurée après élution de la résine dans un volume connu d'une solution d'acide nitrique (1 M), calculée selon l'équation :

$$M = \frac{C_e (V_g + V_e)}{f_e}$$

- C_e : concentration en métal dans l'éluât.
- V_g et V_e : volumes de gel et le volume d'élution.
- f_e : le facteur d'élution.

La concentration de la fraction métallique labile à l'interface de la DGT peut être calculée par l'équation :

$$C_{DGT} = \frac{M \Delta g}{D t A}$$

- M est la quantité de métal accumulée sur la résine.
- Δg représente l'épaisseur de la couche de diffusion.
- t représente la durée d'exposition du dispositif dans la solution.
- A est la surface du gel en contact avec la solution.
- D est le coefficient de diffusion du métal dans le gel.

Dans les premières étapes du développement de la DGT, cette technique a été caractérisée d'abord pour mesurer les Ni, Zn, Mn, Fe, Cu et Cd avec une résine échangeuse de cations (e.g. Chelex100) (Zhang et Davison, 1995). Par modification de la couche de liaison, la DGT a été développée pour les autres espèces. Par exemple, avec une résine à base de ferrihydrite synthétique (un oxyhydroxyde de fer), la DGT est utilisée pour la détermination du phosphate anionique labile (Zhang et al. 1998) et, dans les années suivantes, elle a été utilisée pour les formes inorganiques de l'As (Panther et al. 2008).

La DGT avec résine ferrihydrite (FH) DGT a été également appliquée au Se dans le sol (Sogn et al. 2008) ainsi qu'au P, As, V, W, Mo, Sb et U dans les sédiments (Stockdale et al. 2008, 2010). Enfin, une couche de liaison mixte à base de Chelex et de FH a été utilisée pour mesurer simultanément les cations (Mn, Cu, Zn, Cd) et les anions (phosphate et molybdate) (Mason et al. 2005). Plus récemment, la technique DGT est devenue un outil utile pour mimer l'absorption des métaux par les plantes (Zhang et al. 2004; Song et al. 2004; Koster et al. 2005).

De nombreux chercheurs ont rapporté la corrélation entre la concentration en métaux mesurée par DGT et l'absorption des métaux par les plantes. Muhammad et al. (2012) ont montré que les concentrations de Zn et de Cd dans la plante étaient fortement corrélées avec leurs concentrations mesurées par DGT. Alma's et al. (2006) ont également trouvé une corrélation positive significative entre la concentration de Zn mesurée par DGT et sa concentration dans des cultures de ray-grass.

4.5.1. Labilité des espèces mesurées par la technique DGT

L'utilisation de la technique DGT peut permettre d'obtenir des informations sur la cinétique de dissociation des complexes métalliques et d'échange du métal entre la phase solide des sols et les eaux interstitielles, *via* l'interprétation des flux d'accumulation du métal sur la résine chélatrice. Ces flux sont régulés par: la taille des pores de l'hydrogel de

diffusion, la nature et l'épaisseur du gel diffusif, la concentration du métal en solution et la capacité de dissociation de ces complexes pendant leur parcours vers la résine (Hooda et al. 1999; Lehto et al. 2006).

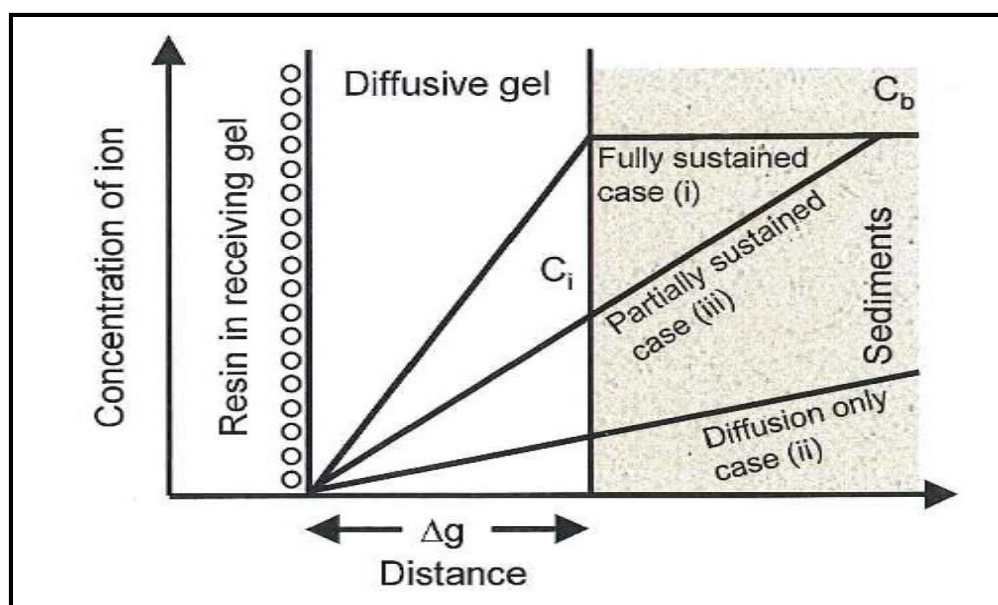


Figure 1.5: Représentation schématique du gradient de concentration dans un DGT en contact avec l'eau interstitielle dans le cas où le relargage de la phase solide est rapide (i), lente (iii) et inexistante (ii) (d'après Zhang et al. (1995)).

Selon le flux mesuré par les DGT et la concentration métallique à l'interface DGT/sol, il est possible de distinguer 3 cas (Fig. 1.5) :

- i. Complètement soutenu : la disparition des métaux de l'eau interstitielle est compensée par le relargage de ces mêmes métaux depuis la phase solide. Le flux mesuré par les DGT est toujours maintenu à sa valeur maximale tout le temps du déploiement de la sonde. La concentration moyenne C_i calculée par les DGT correspond à la concentration C_b de l'eau interstitielle du sol.
- ii. Diffusion seulement : la phase solide ne relargue pas de métaux. L'approvisionnement des métaux vers les DGT n'est réalisé que par diffusion des métaux dans l'eau interstitielle du sol. Le flux métallique mesuré par les DGT diminuera avec le temps d'exposition en raison de l'appauvrissement de la phase dissoute. Pour un DGT standard avec un gel de diffusion de 0,8 mm d'épaisseur, le flux mesuré par ce dernier au bout de 24 heures correspond à 10 % du flux

initial. Autrement dit, la concentration moyenne mesurée par les DGT est 10 fois inférieure à celle de la phase dissoute $C_i \approx 0.1C_b$ (Harper et al. 1998).

- iii. Partiellement soutenu : le sol relargue des métaux mais la cinétique de désorption ou de dissolution de ces phases n'est pas assez rapide pour compenser la diminution des concentrations de l'eau interstitielle du sol induite par la présence de la DGT. La concentration moyenne mesurée par les DGT sera inférieure à celle de la phase dissoute mais à un degré moindre du cas ii ($0.1C_b < C_i < C_b$).

5. Effet des propriétés physico-chimiques et rhizosphérique sur le comportement des éléments traces métalliques dans les sols

La biodisponibilité et la mobilité des ETM varient à la fois selon leurs concentrations et leur spéciation dans les sols. Elles sont contrôlées par les paramètres physico-chimiques des sols (pH, potentiel redox, texture, teneur en matières organiques,... etc.) ou biologiques (plantes et microorganismes) (Hough et al. 2003; Tazisong et al. 2004). Les facteurs les plus influants sur la biodisponibilité et la mobilité des ETM dans les sols sont détaillés ci-dessous.

5.1. Le pH

Le pH du sol est un paramètre très influant, lequel joue un rôle majeur dans de nombreuses réactions physico-chimiques telles que les réactions de précipitation /solubilisation ou l'adsorption/désorption sur les phases solides du sol et la spéciation des métaux en solution aqueuse. Le pH influence également la spéciation des métaux et aussi leurs interactions avec les phases solides du sol (Weng et al. 2005). La diminution du pH de l'eau interstitielle du sol est accompagnée par un accroissement du nombre de protons dans la solution lesquels entrent en compétition avec les cations métalliques adsorbés sur les phases solides du sol et provoquent leur libération dans la phase aqueuse (Swift et McLaren, 1991). C'est l'inverse pour les oxyanions.

D'une façon générale, la solubilité des éléments chimiquement stables sous forme de cations tels que Cd, Pb et Zn diminue lorsque le pH augmente. Inversement pour les éléments chimiquement stables sous forme d'anions tels que Cr(VI), As et Se, la solubilité augmente avec le pH (Deneux-Mustin et al. 2003) (Fig. 1.6).

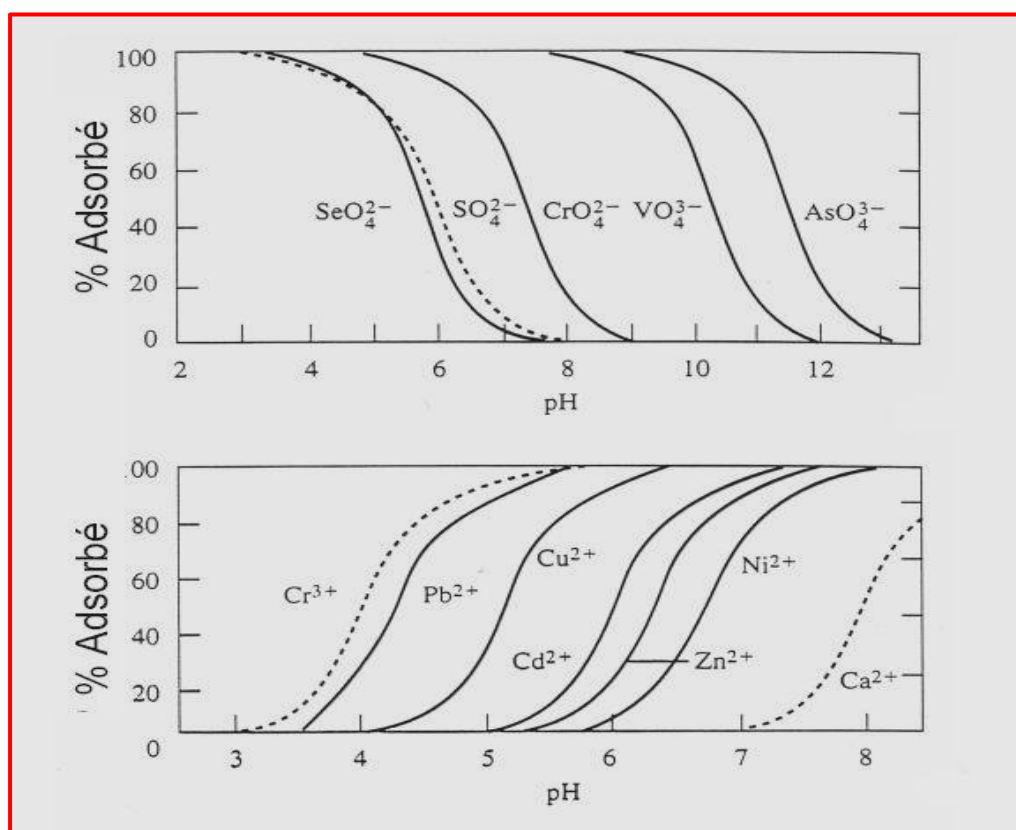


Figure 1.6: Fraction de métaux et métalloïdes adsorbés (cations et anions) sur une surface d'hydroxyde de fer (III) en fonction du pH (d'après Sigg et al. 2001).

5.2. Le potentiel redox

Les conditions d'oxydo-réduction (Eh) déterminent le comportement des éléments chimiques à plusieurs valences. Elles mesurent l'aptitude d'un milieu à fournir les électrons à un agent oxydant ou à retirer des électrons à un agent réducteur. L'Eh influence notamment la capacité d'un ETM à se fixer sur une phase réceptrice en modifiant le degré d'oxydation de l'élément. Une modification du produit de solubilité de cette association potentielle peut de ce fait intervenir, soit en la privilégiant soit en la défavorisant (Deneux-Mustin et al. 2003) (Fig. 1.7).

La solubilité de plusieurs métaux et métalloïdes (Mn, As et Cr) est directement corrélée avec l'Eh et le pH (Masscheleyn et al. 1991). En outre, le Cd, Pb et Zn possèdent un nombre plus faible d'états d'oxydation. La solubilité de ces éléments est affectée indirectement par l'Eh et le pH, notamment avec la dissolution réductrice des oxy-hydroxydes de Fe et de Mn en conditions réductrices (Chuan et al. 1996).

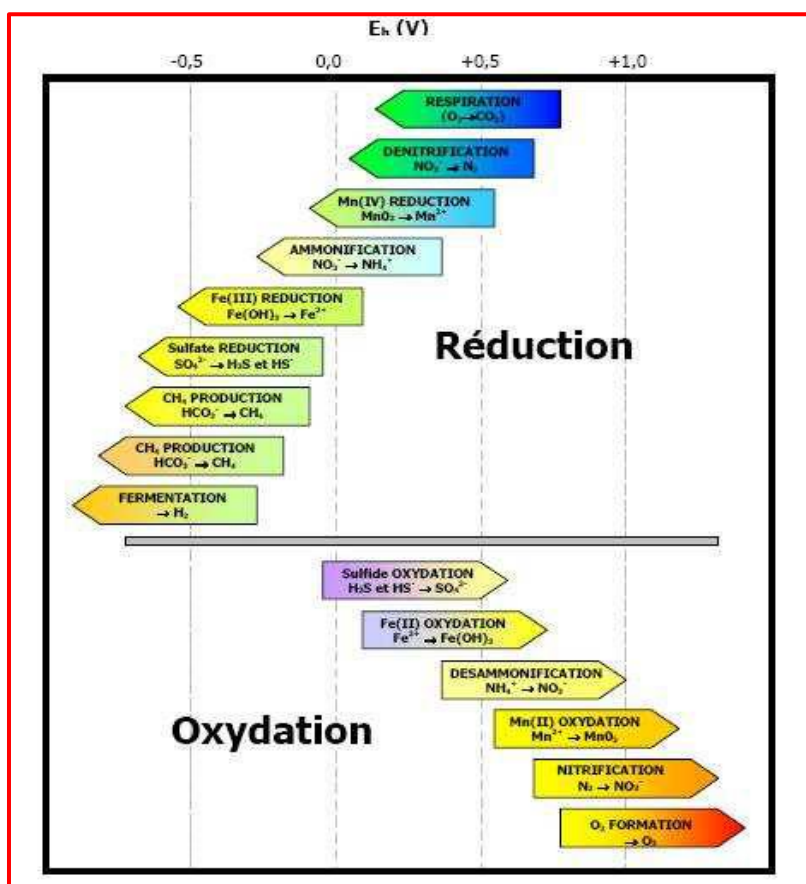


Figure 1.7: Domaine de potentiel d'oxydoréduction (d'après Sigg et al. 2001).

5.3. Température du sol

La température du sol joue un rôle indirect sur les réactions géochimiques et influence également l'activité biologique du sol et par conséquent la production de substances acides ou complexantes issues de la biodégradation de matières organiques. L'élévation de la température agit directement sur la dissolution de composés fixant les ETM, facilitant leur absorption par les plantes (Deneux- Mustin et al. 2003; Remon, 2006).

Serpaud et al. (1994) ont montré qu'entre 10°C et 30°C, l'effet de la température sur la capacité d'adsorption des sédiments n'est pas très significatif. Par contre, ces auteurs ont remarqué une diminution de l'adsorption entre 30°C et 40°C, surtout dans le cas du Cu, Zn et Cd. Pourtant dans le cas du plomb, l'influence de la température dans cet intervalle de température (10 - 40°C) n'est pas significative.

5.4. Effet de l'environnement rhizosphérique

La rhizosphère est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les micro-organismes associés qui sont capables d'influencer le transfert sol-plante des éléments trace métalliques. Le mot rhizosphère a été introduit en 1904 par Hiltner ; il correspond au volume de sol directement influencé par l'activité racinaire (Hinsinger 1998a).

Le sol rhizosphérique, à savoir les quelques millimètres de sol entourant les racines des plantes est influencé par l'activité biologique de celles-ci. C'est un système très dynamique caractérisé par des boucles de rétroaction entre les caractéristiques du sol, les processus racinaires et la dynamique de la population microbienne associée.

La rhizosphère correspond en effet à un microenvironnement géochimique influencé par l'activité des plantes (exsudats racinaires (composés d'acides organiques et de sidérophores), respiration,... etc.) et des microorganismes (minéralisation de la matière organique etc.). Cette activité influence très localement l'écodynamique des ETM, directement (précipitation, complexation, absorption des ETM) et indirectement (effets rhizosphériques sur le pH et le potentiel redox, dissolution de minéraux,...etc.). L'étude de l'influence des processus rhizosphériques sur la mobilité, la disponibilité et la toxicité des ETM dans les sols est basée en particulier, sur le rôle des associations racines-mycorhizes-bactéries dans la transformation des ETM, est donc représente un enjeu majeur pour comprendre l'écodynamique des ETM en contexte de phytoremédiation ou d'atténuation naturelle des sols contaminés.

Le type de plante et son activité photosynthétique ou encore les propriétés physico-chimiques du sol (taille des particules, structure du sol, teneur en eau, etc.) sont les facteurs qui déterminent la géométrie de la rhizosphère (Lemanceau et al. 1998). Les racines excrètent diverses substances minérales et organiques qui peuvent modifier directement ou indirectement les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol environnant.

Les conditions de la rhizosphère peuvent influencer de manière significative la mobilité des ETM dans les sols. Les processus impliqués sont actifs ou passifs, biologiques ou physico-chimiques et amènent à la solubilisation des ETM ou au contraire à leur insolubilisation en modifiant soit directement leur statut (soluble/insoluble, oxydé/réduit, complexé/non complexé et adsorbé/non adsorbé) soit en agissant sur leurs phases porteuses (altération, dissolution et précipitation) (Hinsinger 1998a; Gadd 1996; Jones et al. 1996a; Zhang et al. 2002; Deneux-Mustin et al. 2003).

Les différents processus bio-physico-chimiques qui modifient la mobilité des ETM dans un sol sont présents de manière locale, liés aux spécificités de la rhizosphère qui sont

susceptibles de les modifier. Il est donc nécessaire de savoir dans quelles mesures ces modifications chimiques et en particulier les modifications de pH peuvent influencer la disponibilité des ETM dans la rhizosphère et *in fine*, leur biodisponibilité pour les plantes.

5.4.1. Acidification/alcalinisation

Avec l'action physique des racines et l'exsudation, la modification du pH de la rhizosphère est un processus majeur pour modifier son environnement racinaire. Le pH de la rhizosphère est le plus souvent différent de celui du sol ambiant, un écart de 2 unités étant fréquent. L'azote (N), nutriment essentiel, prélevé par la très grande majorité des plantes, sous forme anionique, l'ion nitrate (NO_3^-) ou cationique, l'ion ammonium (NH_4^+) joue un rôle important dans les changements de pH des sols. Les prélèvements de cations NH_4^+ stimulent la libération de protons H^+ ou un prélèvement d'anions. Au contraire, les prélèvements d'anions NO_3^- stimulent la libération d'ions OH^- , HCO_3^- , ou un prélèvement de cations (Hinsinger 2001; Hinsinger et al. 2003). Selon la forme azotée disponible dans le milieu, la rhizosphère sera donc acidifiée ou au contraire alcalinisée.

Les plantes sont capables de modifier le pH de leur rhizosphère en fonction de leur physiologie propre mais aussi du pH initial du sol (Youssef et Chino 1989a). Ainsi Taylor et Foy (1985) ont montré que des variétés de blé tendre tolérantes à l'Al présentaient une cinétique de prélèvement de NH_4^+ plus faible et inversement une cinétique de prélèvement de NO_3^- plus importante que des variétés non tolérantes.

5.4.2. Exsudation

Les exsudats représentent la part dominante de la rhizodéposition et correspond à celle qui est la plus rapidement métabolisée par les microorganismes (Gobat et al. 1998). Ce sont de petites molécules organiques, solubles dans l'eau ou volatiles comme les glucides, acides organiques, acides aminés, acides gras, stérols, vitamines, enzymes, nucléotides, etc. (Dakora et al. 2002).

En fonction des propriétés de dissociation et du nombre de leurs groupements carboxylés, les acides organiques peuvent présenter des charges négatives impliquées dans la complexation de cations métalliques en solution et le déplacement d'anions depuis la matrice du sol. Ils participent aussi à de nombreux processus comme la mobilisation par les plantes et les microorganismes des nutriments (P, Fe,...etc.), la détoxification des métaux par les plantes (Al, ETM), le développement microbien dans la rhizosphère et la dissolution des minéraux du sol qui mène à la pédogenèse (Jones, 1998) (Fig. 1.8).

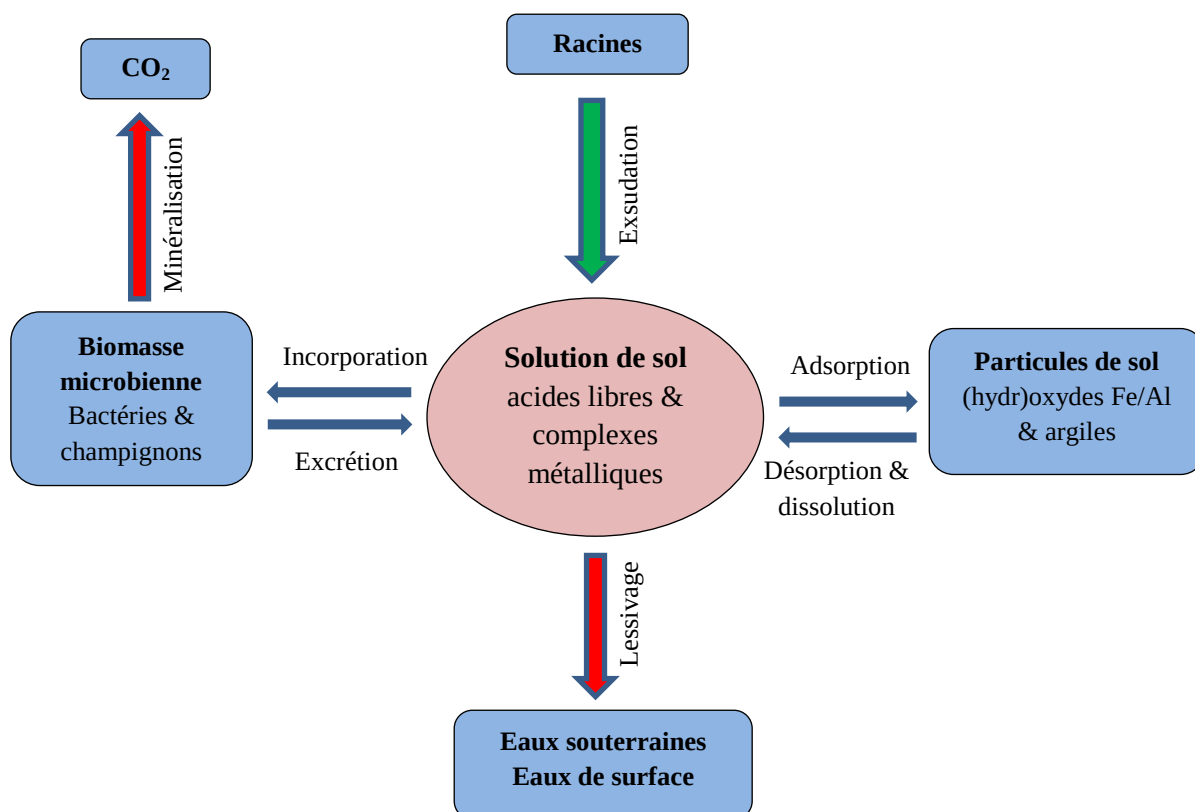


Figure 1.8: Diagramme schématisant de façon simplifiée les flux d'exsudation, de sorption, d'assimilation et de minéralisation des exsudats racinaires dans la solution de sol (d'après Jones et al. 1998).

6. L'interaction des ETM avec les constituants du sol

Plusieurs mécanismes d'interaction physico-chimique sont impliqués dans la rétention et l'échange des ETM à l'interface solide - liquide : l'adsorption non spécifique, l'adsorption spécifique, la précipitation/co-précipitation, la complexation de surface et la fixation par la matière organique (Fig. 1.9).

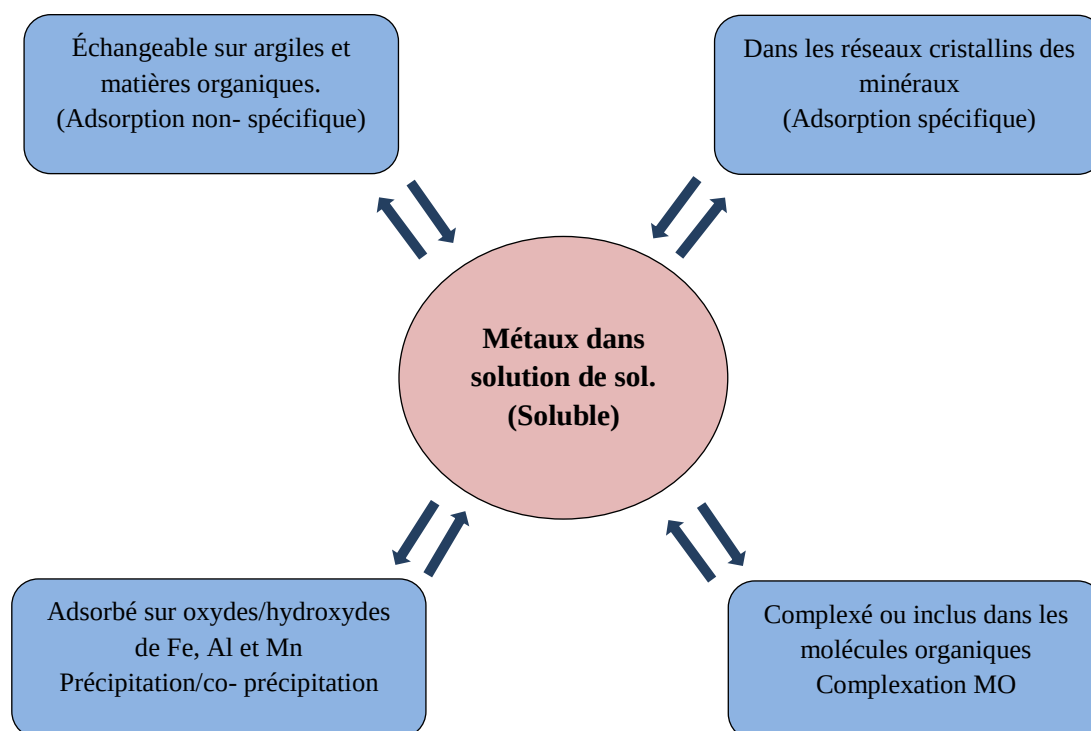


Figure 1.9: Différentes formes et mécanismes de rétention des ETM dans le sol (Singh et Steinness, 1994).

6.1. Adsorption

L'adsorption est définie comme la fixation de matière à l'interface solide - liquide et elle est la base de la plupart des processus aux interfaces (Sposito, 1989). Deux mécanismes d'adsorption sont habituellement identifiés: l'adsorption physique non spécifique (physisorption) et l'adsorption chimique spécifique (chimisorption).

6.1.1. Adsorption non spécifique (physisorption)

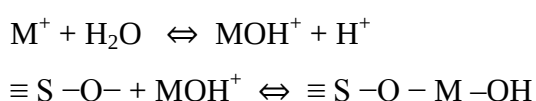
Dans le cas de l'adsorption non spécifique, les cations en solution chargés positivement sont attirés par des forces électrostatiques de type Van der Waals ou coulombiennes, vers les charges négatives de la surface des particules du sol telles que les particules argileuses (Majone et al. 1996), les oxydes (Martinez et McBride., 1998) et les substances humiques (Andreux, 1997; Hatira et al. 1990). L'énergie de la liaison est alors relativement faible.

Pour l'adsorption non spécifique, les atomes de métal ne sont pas directement en contact avec la surface des particules du sol mais sont présents au sein d'une sphère de molécules d'eau enrobant les particules du sol. L'adsorption physique se produit sans

modification de la structure moléculaire et elle est réversible. On nomme ce type d'interaction «complexe de sphère externe » (Sposito, 1989) (Fig. 1.10).

6.1.2. Adsorption spécifique (chimisorption)

L'adsorption spécifique est une liaison chimique forte, sans molécule d'eau interposée entre les cations métalliques et un atome du substrat. On parle de formation de complexe de sphère interne (Alloway, 1995) (Fig. 1.10). En effet, la réaction d'adsorption, engendrant la formation de complexes de sphère interne peut être décrite selon l'équation suivante (Evans, 1989):



Les éléments métalliques ainsi chimisorbés seront beaucoup moins susceptibles d'être mobilisés. Le complexe de sphère interne fait intervenir des liaisons ioniques, covalentes ou une combinaison des deux (Blanchard, 2000), plus stables que la liaison électrostatique de sphère externe.

6.2. Précipitation et co-précipitation

La précipitation et la co-précipitation sont des phénomènes qui jouent un rôle très important pour retenir les ETM dans les sols (Sposito, 1989). La précipitation est définie comme le passage à l'état solide d'un des solutés d'une solution. Dans le milieu naturel, les métaux et les métalloïdes précipitent principalement sous la forme d'hydroxydes, de sulfures et de carbonates (Fig. 1.10). La précipitation est généralement favorisée par des pH élevés pour les cations métalliques, car la concentration en solution des ions d'hydroxyde ou de carbonate augmente avec le pH.

La co-précipitation est définie comme la précipitation simultanée d'un élément chimique conjointement avec d'autres éléments (Zn, Pb, Cu, Ni, Cd) qui peuvent co-précipiter avec des oxydes de fer, de manganèse et des phyllosilicates (Alloway, 1995; Sposito, 1989). Le pH du sol et de la solution de sol, la température, le potentiel d'oxydo-réduction et la concentration en solutés sont les facteurs majeurs qui contrôlent la précipitation et la co-précipitation des éléments traces métalliques dans les sols (Fournier- Bidoz and Garnier Laplace, 1994; Garnier-Laplace et al. 1997).

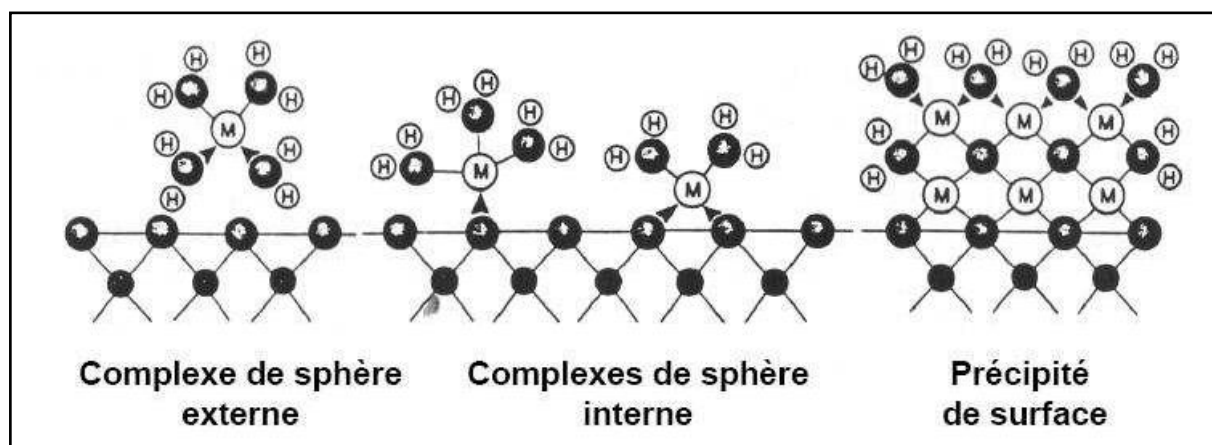


Figure 1.10: Représentation schématique de deux types de complexation de surface : complexe de sphère interne et complexe de sphère externe et de la précipitation de surface. La ligne horizontale présente la frontière entre le minéral et la solution. Les petits cercles noirs dans le minéral représentent les ions métalliques et les cercles plus gros représentent l'oxygène. M représente les cations sorbés et H dénote l'hydrogène dans la molécule d'eau solvatée par le complexe de surface (d'après Krauskopf and Bird, 1995).

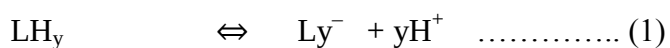
6.3. Complexation

Les complexes sont des entités chimiques qui possèdent une liaison de coordination entre un atome « donneur » (ligand avec au moins une paire d'électrons libres) et un atome ou un ion métallique « accepteur » (avec au moins un orbital vide) (Stumm et Morgan, 1996). Des liaisons covalentes de coordination peuvent également s'établir entre les atomes d'oxygène et des métaux de transition, ou bien des liaisons hydrogène faisant intervenir les groupements hydroxylés de la surface et ceux des ions complexes de la solution.

Les cations métalliques, ainsi que les oxyanions tel que l'oxyanion de l'As et du Sb peuvent former des complexes avec différents ligands organiques et inorganiques présents dans la phase aqueuse du milieu (Evans, 1989).

6.4. Fixation par la matière organique

La matière organique contient beaucoup de groupements réactifs (OH, COOH, C=O, SH) qui sont des bases de Lewis. Par conséquent, la matière organique est réactive vis-à-vis des ions métalliques (acides de Lewis). La formation des complexes de sphère interne des métaux avec la matière organique est considérée comme une réaction d'échange entre le H^+ du groupe fonctionnel et les ions métalliques en solution (équation 1 et 2) (McBride, 1994) :



Etant donné que la plupart des groupements réactifs sont des acides faibles et que la réaction (1) est nécessaire afin de former des complexes, la réactivité augmente quand le pH augmente. Manceau et al. (1996) ont étudié la spéciation du Pb dans l'horizon de surface d'un sol de jardin situé à proximité d'une usine de production de plomb. Ils ont montré que le Pb était complexé par des groupements réactifs de la matière organique.

7. Présentation des ETM considérés dans cette étude

7.1. Le zinc (Zn)

Le zinc est un métal qui possède une masse atomique de 65,37 g/mol ; il appartient au groupe II-B, sa structure électronique étant $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^2$. En raison du remplissage complet de la couche 3d, on le trouve généralement à l'état d'oxydation II. Le zinc est utilisé comme agent anticorrosion, ainsi que pour la galvanisation de l'acier, mais il entre également dans la composition de nombreux alliages (laiton), dans des produits cosmétiques (crèmes, shampoings), batteries, pigments, peintures et dans la fabrication d'accumulateurs.

Les principaux minerais de zinc les plus répandus dans la nature sont la sphalérite (ZnS), des carbonates ZnCO_3 (smithsonite où calamine) et les silicates tel que la willémitte (Zn_2SiO_4) (Bihouix et Guillebon 2010). Les différentes sources anthropiques de pollution sont l'épandage agricole d'effluents d'élevage ou de boues urbaines, les activités urbaines et le trafic routier.

Les concentrations totales de zinc dans les sols naturels varient entre 10 et 300 mg kg^{-1} et sont en moyenne de 50 mg kg^{-1} (Adriano 1986; Pais and Benton 2000). En France, les teneurs de zinc dans les sols naturels varient entre 10 et 100 mg kg^{-1} (Baize 1997). En contexte contaminé, si la concentration en Zn dans le sol dépasse 300 mg kg^{-1} , un effet toxique sur différentes espèces de micro-organismes du sol apparaît, réduisant leur capacité de dégradation des débris végétaux et de fixation de l'azote atmosphérique (Adriano 1986; Baize 1997).

Le zinc est considéré comme un métal facilement soluble par rapport aux autres métaux dans le sol. Les concentrations de Zn dans les solutions de sol varient de 4 à 270 $\mu\text{g l}^{-1}$, selon le type de sol et les techniques utilisées pour obtenir la solution (Pitter 1999). Pour des sols fortement contaminés, Itoh et al. (1979) ont rapporté une concentration de 17 000 $\mu\text{g l}^{-1}$ en Zn dans la solution du sol. Cependant, dans un sol naturel mais très acide ($\text{pH} < 4$), la concentration en zinc a été trouvée en moyenne de plus de 7000 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Les formes solubles de Zn sont facilement disponibles pour les plantes et l'absorption de Zn par des plantes a été rapportée comme étant linéaire avec sa concentration dans la solution du sol mais aussi avec la concentration totale dans le sol (Zhang et al. 2004 ; Muhammad et al. 2012).

La toxicité du zinc vis-à-vis des plantes se traduit par une chlorose en fer pouvant aller jusqu'à la nécrose des tissus et se situe à des teneurs dans les sols de 150 mg kg^{-1} et est amplifiée par l'acidité du milieu. La phytotoxicité du zinc est également amplifiée par la pollution en Cd qui accompagne souvent celle du Zn et qui touche tous les organismes vivants (flore et faune du sol) (Adriano 2001). Les valeurs de la phytotoxicité pour le Zn sont de 50 à 100 mg kg^{-1} pour une extraction à l'EDTA et de 250 à 500 mg kg^{-1} pour les concentrations totales du sol (Legros et al. 2002).

7.2. Le plomb (Pb)

Le plomb est un métal gris dense et malléable du groupe IV-A du tableau périodique, de masse atomique 207,2 g/mol. Il possède une structure électronique $[\text{Xe}] 4f^{14}5d^{10}6s^26p^2$. Le plomb est un élément non essentiel ; il est moins biodisponible que les autres métaux (van der Perk 2006). Depuis 1970 le développement de nouvelles technologies ainsi que la prise en compte des problèmes environnementaux et de santé publique ont conduit à la diminution ou à l'arrêt de l'utilisation du Pb dans certaines applications (canalisation d'eau, soudure, pigments, additifs dans l'essence, gaines des câbles et dans les pesticides).

Les principaux minéraux de plomb sont extraits de minerais sulfurés. Le minéral plombifère le plus répandu est la galène (PbS). Les minerais sulfurés plombifères se trouvent généralement associés avec d'autres minerais sulfurés, principalement ceux contenant du zinc, mais également ceux renfermant du cuivre. Parmi les autres minéraux plombifères, on trouve la cérusite (PbCO_3) et l'anglésite (PbSO_4).

Les teneurs de plomb dans les sols naturels sont en moyenne de 32 mg kg^{-1} (Pais et Benton 2000) et varient entre 2 et 200 mg kg^{-1} . En France les teneurs de plomb dans les sols naturels varient entre 9 et 50 mg kg^{-1} (Baize 1997). Le plomb est lié aux phases solides du sol par adsorption, précipitation et formation de complexes ioniques ou de chélates. Il présente une forte réactivité vis-à-vis des oxydes de fer et de manganèse mais également vis-à-vis des phosphates et de la matière organique (McKenzie 1980; Hettiarachchi et Pierzynski 2002). Ces interactions avec la phase solide contribuent à la faible solubilité et mobilité de cet élément par rapport aux autres métaux et les concentrations relativement faibles de Pb dans les solutions de sols naturels confirment cette hypothèse (Eick et al. 1999; Badawy et al.

2002). Les plus grandes concentrations de Pb sont souvent trouvées dans les horizons supérieurs riches en matière organique des sols non cultivés ; par conséquent la matière organique doit être considérée comme un important puits d'accumulation de plomb dans les sols pollués.

Le facteur pH a un rôle important sur la solubilité du Pb: en effet un pH élevé du sol peut précipiter le Pb sous forme d'hydroxyde, de phosphate ou de carbonate et favoriser la formation de complexes Pb-organique. Il joue également un rôle important dans le transfert du plomb du sol vers les végétaux.

En effet la toxicité du plomb vis-à-vis des plantes dépend de l'espèce végétale considérée, de sa spéciation, des propriétés du sol et enfin du substrat de culture (25 mg kg⁻¹ pour la tomate à plus de 2000 mg kg⁻¹ pour le riz (Adriano 2001), 0.1 – 5 mg kg⁻¹ pour les feuilles d'haricot (Theodoratos et al. 2002), 2 – 11.9 mg kg⁻¹ dans les racines, 0.45 – 9.5 mg kg⁻¹ dans les tiges et 4.20 – 32.5 mg kg⁻¹ dans les feuilles de *Ricinus communis* L. (Vwioko et al. 2006). La bioaccumulation la plus élevée de Pb est généralement rapportée pour les légumes-feuilles (principalement la laitue) cultivée dans un environnement à proximité de fonderies de métaux non ferreux où les plantes sont exposées à des sources de Pb *via* le sol et l'air.

7.3. Le cadmium (Cd)

Le cadmium est un métal blanc argent, très malléable et ductile. Il possède une configuration électronique [Kr] 4d¹⁰ 5s², une masse atomique de 112.4 g/mol et appartient au groupe II-B du tableau périodique. Le cadmium est un élément non essentiel et présente une toxicité élevée. Les apports anthropiques de Cd vers les sols sont importants par rapport aux autres éléments traces, en lien avec les activités industrielles (essentiellement par voie atmosphérique), les engrais phosphatés et l'épandage de déchets (e.g. boues de stations d'épuration).

Dans la nature, le cadmium se trouve sous la forme oxydée (+II) de manière stable. La forme la plus fréquente est le sulfure de cadmium (CdS), ainsi que la forme hydroxyde ou suite à la formation de complexes avec les ions ammonium et cyanides (Adriano 2001). Le cadmium est un sous-produit du raffinage du zinc, plomb et cuivre. Il est utilisé dans l'industrie automobile, dans la fabrication du polyvinyle et dans les batteries.

Les teneurs de Cd dans les sols naturels sont comprises entre 0.06 et 1.1 mg kg⁻¹ (Alloway 1995; Pais & Benton 2000). Dans les sols, le Cd est moins fortement adsorbé que les autres métaux divalents et il est de ce fait plus mobile et plus facilement biodisponible. Il

existe sous forme soluble dans l'eau poreuse du sol: CdCl_2 , CdSO_4 ou sous forme de complexes insolubles inorganiques ou organiques avec les différents constituants du sol.

La phytodisponibilité du Cd est majoritairement gouvernée par le pH. Des nombreuses études ont identifié le pH du sol comme un facteur important influençant la mobilité du cadmium dans le sol (Chanmugathas et Bollag 1987; Christensen 1989b). La plupart des études soutiennent qu'un mouvement significatif de cadmium dans la matrice du sol et vers d'autres compartiments est probable dans des conditions acides.

La phytotoxicité du Cd dépend de l'espèce végétale et de la variété étudiée. Les taux d'absorption du cadmium par les plantes sont variables et dépendent également de l'espèce végétale (Kuboi et al. 1986; Kim et al. 1988), de la concentration de cadmium dans le sol de même que des autres facteurs physico-chimiques ayant une influence sur la biodisponibilité du cadmium. Des études ont montré l'accumulation de cadmium dans les feuilles et dans les racines chez certaines plantes (*Nicotiana tabacum* L., *Nicotiana rustica* L., and *Zea mays* L., *Brassica oleracea* (Mench et al. 1989; Boon et Soltanpour 1992). Les concentrations les plus faibles de cadmium dans les sols pour lesquelles des effets phytotoxiques ont été observés sont de 2.5 et 4 mg kg⁻¹. Les symptômes de toxicité chez les plantes se traduisent notamment par la chlorose en fer des plantes et une diminution de la croissance pouvant aller jusqu'à la nécrose. Le cadmium, dont la principale voie de contamination est l'ingestion, est également toxique pour l'Homme.

7.4. L'arsenic (As)

L'arsenic présente des propriétés intermédiaires entre celles des métaux et des métalloïdes et est présent dans les trois compartiments de l'environnement (pédosphère, hydrosphère et atmosphère). Il possède une configuration électronique $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^24p^3$ et une masse atomique de 74.92 g/mol.

Dans le milieu naturel, on trouve de l'arsenic assez abondamment dans la croûte terrestre, le sol, l'eau et l'air. On le retrouve dans de nombreux minéraux. L'arsenic peut se retrouver de façon naturelle dans les sols et l'eau poreuse par dissolution de dépôts minéraux ou de roches contenant de l'arsenic inorganique (arsénopyrite $[\text{FeAsS}]$, souvent associé à la présence d'or). Il présente deux degrés d'oxydation As (III) et As (V): arsénites et arsénates (Laperche et al. 2003; O'Day 2006).

L'As est souvent associé aux activités minières et à la combustion de ressources organiques fossiles. Il a été utilisé en agriculture en tant que pesticide (arséniate de plomb) et en tant que durcisseur dans les cartouches de chasse.

Dans les sols la concentration en arsenic est généralement comprise entre 0.1 et 40 mg kg⁻¹ d'après Bowen (1979) et entre 1 et 50 mg kg⁻¹ d'après Backer et Chesnin (1975), ce qui correspond à une moyenne de 6 mg kg⁻¹ dans les sols non contaminés.

L'arsenic peut exister sous diverses formes inorganiques : sous quatre états d'oxydation, qui sont, du moins oxydé au plus oxydé: As (-III), As (0), As (+III) et As (+V). C'est un élément non essentiel et un poison puissant dont la toxicité varie avec l'état d'oxydation : les arsénites (III) sont plus toxiques et plus mobiles dans les sols que les arsénates (V). La disponibilité apparente de l'arsenic dans le sol n'est donc pas nécessairement reliée au taux d'absorption de l'arsenic par les végétaux.

Le pH du sol joue aussi un rôle dans l'absorption de l'arsenic par les végétaux : les pH acides (<6) et basiques (>8) favorisent sa disponibilité (Juste et al. 1995). Il présente des propriétés chimiques proches de celles du P, ce qui peut en partie expliquer sa toxicité.

Les concentrations d'As dans les plantes cultivées dans des sols non contaminés, varient entre 0,009 à 1.5 mg kg⁻¹ de la masse sèche (Kabata-Pendias et Pendias, 1979).

Parmi les plantes entrant dans l'alimentation humaine, les laitues présentent la plus forte capacité d'accumulation de l'arsenic avec une teneur maximale relevée de 1.4 mg kg⁻¹ de matière sèche pour une concentration dans le sol de 290 mg kg⁻¹. Des résultats similaires ont été obtenus par Xu et Thornton (1985) dans des jardins potagers, présentant des sols avec des teneurs en arsenic comprises entre 144 et 892 mg kg⁻¹.

7.5. L'antimoine (Sb)

L'antimoine est un élément chimique semi-métallique de couleur gris; il se situe dans le groupe 15 entre l'arsenic et le bismuth dont il possède certaines des propriétés. Il possède une configuration électronique [Kr] 4d¹⁰5s²5p³ et une masse atomique de 121.7 g/mol. Il présente des propriétés intermédiaires entre celles des métaux et des non-métaux. L'antimoine est présent dans de nombreux minéraux, souvent alliés au plomb, sous forme d'oxyde ou de sulfure. En général quatre espèces chimiques sont prises en considération :

- Sb (-III), espèce chargée négativement (anion antimoniure).
- Sb (0), forme élémentaire présentant un aspect métallique.
- Sb (+III), forme ionisée, possédant des propriétés réductrices.
- Sb (+V), forme ionisée, possédant des propriétés oxydantes.

Comme pour l'arsenic, l'état de valence de l'antimoine, Sb (III) et Sb (V), affecte considérablement sa solubilité dans les milieux géochimiques, c'est-à-dire que sa spéciation influe fortement sa rétention et les processus de transport dans les sols.

Le Sb est un élément non essentiel pour les végétaux ; il est présent sous forme de traces dans les sols ($0.3 - 8.4 \text{ mg kg}^{-1}$) (Murciego et al. 2007). Toutefois de fortes concentrations (500 mg kg^{-1}) de cet élément peuvent être rencontrées dans certains sols, elles sont d'origine anthropogénique principalement du fait de l'activité minière et métallurgique ou générées par la combustion du charbon (Hammel et al. 2000; Gebel et al. 1998). Dans le processus d'extraction séquentielle, la majorité du Sb est présente dans la fraction dite résiduelle qui est généralement considérée comme étant très stable à long terme (Wilson et al. 2010; Filella 2011). Cette fraction résiduelle peut atteindre jusqu'à 98% du Sb total dans un sol contaminé en contexte minier (He 2007).

Dans la littérature, il existe peu d'informations sur l'absorption, la toxicité, le transport et les mécanismes de toxicité du Sb vis-à-vis des plantes. En effet, peu de plantes ont été décrites comme bioaccumulatrices du Sb (*Digitalis purpurea*, *Erica umbellata* et *Calluna vulgaris* (Pratas et al. 2005). Comme les métaux et métalloïdes mentionnés ci-dessus, la toxicité du Sb vis-à-vis des plantes dépend de l'espèce végétale considérée, de sa spéciation, des propriétés du sol et du type de plante ($7 - 50 \text{ mg kg}^{-1}$ pour les arbres et arbustes, 0.06 mg kg^{-1} pour les plantes terrestres et $< 2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ pour le maïs et la pomme de terre (Shakelette et al. 1978; Bowen 1979; Laul et al. 1979).

8. Utilisation de *Populus euramericana* génotype Dorskamp en phytoremédiation

Pour décontaminer ces sols, il existe différentes techniques, principalement physicochimiques et thermiques, qui sont lourdes à mettre en place, coûteuses et qui au final perturbent de façon importante l'équilibre des sols et la fertilité de l'écosystème (Hazrat et al. 2013). La phytoremédiation apparaît alors comme une méthode alternative, écologique et peu coûteuse (Chaney 1983) pour décontaminer un sol pollué. Elle consiste à utiliser des plantes pour diminuer l'effet toxique des EM présents dans le sol. Son objectif est double, elle permet : (i) une phytostabilisation des contaminants dans le sol pour limiter leurs dispersions dans l'environnement et (ii) une phytoextraction des polluants (Vangronsveld et al. 2009). Pour cela, une plante efficiente en terme de phytoremédiation doit : (i) présenter une forte production de biomasse, (ii) être facilement cultivable et (iii) présenter une forte tolérance vis-à-vis de la translocation et de l'accumulation d'EM au niveau de ses parties aériennes.

Actuellement, environ 450 plantes sont connues pour être hyperaccumulatrices d'EM, la plupart le sont pour le nickel et/ou le zinc. Parmi celles-ci, la famille des *Brassicaceae* occupe une place importante malgré sa faible production de biomasse (Kumar et al. 1995). Une alternative à l'usage de plantes herbacées consiste à utiliser des espèces ligneuses présentant une forte production de biomasse ainsi qu'une importante capacité à stocker les EM dans cette biomasse, on parle alors de dendroremédiation (González-Oreja et al. 2008). De plus, ces espèces ont la capacité de prospector un grand volume de sol, ce qui potentiellement permet une meilleure phytostabilisation et phytoextraction des EM. Parmi celles-ci, les salicacées sont de bon candidat (Mala et al. 2010), car ce sont des espèces rustiques qui présentent une croissance rapide et une importante production de biomasse dépendante d'une forte consommation en eau. De plus, leur utilisation en Taillis à Courte Rotation (TCR) ou en Taillis à Très Courte Rotation (TTCR) permet la formation d'une biomasse suffisante pour être valorisée dans diverses filières économiques (bois-énergie, construction, papier,...etc.) (Alggreen et al. 2013, Toillon et al. 2013). Ainsi certains terrains contaminés et laissés à l'état de friches industrielles pourraient être réutilisés pour la production de biomasse énergie, sans entrer en compétition avec les terres utilisées pour les productions alimentaires, ce qui permettrait également de réduire l'utilisation des énergies fossiles (McKendry, 2002a, b). A ce titre, le peuplier fait l'objet d'études dans ce double objectif de phytoremediation et de production de biomasse (Laureysens et al. 2005).

De nombreuses espèces de peupliers ont été décrites et parmi celles-ci seulement quelques-unes ont été étudiées quant à leurs capacités phytoremediatrices. Certaines sont prometteuses, pour notre étude nous en avons retenu *Populus euramericana* genotype Dorskamp, qui est capable d'accumuler les ETM (Pottier et al. 2015) et qui présente une bonne croissance sur des sites contrastés d'un point de vue édaphique (Bonhomme et al. 2008).

Chapitre 2

Méthodes instrumentales utilisées dans la présente étude pour quantifier les éléments traces métalliques

1. Introduction

Dans la plupart des laboratoires d'analyse inorganique, l'analyse des éléments traces est généralement effectuée en utilisant des techniques instrumentales telles que:

- i) La spectrométrie de masse à plasma inductif couplé (ICP-MS),
- ii) La spectroscopie d'absorption à rayons X (XRF),
- iii) La spectroscopie d'absorption atomique flamme (SAAF),
- iv) La spectrométrie d'émission atomique à plasma inductif couplé (ICP-AES),
- v) La spectroscopie d'absorption atomique en four de graphite (GF-AAS).

Dans notre étude, plutôt que de nous attacher à décrire précisément les techniques de XRF et d'ICP-MS, nous développerons leurs principes, leurs composantes de base et leurs modes de fonctionnement, pour ensuite détailler les forces et faiblesses de chacune.

1.1. Spectrométrie de Fluorescence X (XRF)

Précision, vitesse et simplicité sont les caractéristiques les plus importantes pour les méthodes d'analyse qui sont utilisées pour la détermination élémentaire dans les études environnementales. La plupart des techniques utilisées pour la détermination des éléments traces dans des échantillons environnementaux, comme la spectroscopie atomique (FAAS et ICP-AES) a besoin d'acides forts pour une destruction préalable de la matrice de l'échantillon solide. Ces acides forts peuvent conduire à des problèmes de contamination par les réactifs utilisés ou des erreurs dans les concentrations mesurées par perte d'éléments en raison de la solubilisation incomplète ou d'une évaporation (Hoenig. 2001; Hoenig et al. 1998).

Au cours des dernières années, l'utilisation d'autres méthodes d'analyse directe a été développée pour résoudre les problèmes liés à la destruction de la matrice. Une de ces méthodes est la Spectrométrie par fluorescence X (XRF) (Potts et al. 2004). C'est une méthode d'analyse utilisée pour la détection et la quantification des éléments présents dans des échantillons liquides, solides ou en poudre. Elle permet de doser tous les éléments dont le numéro atomique « Z » est supérieur ou égal à 13 (Arabi, 1997).

Les spécifications les plus importantes de la XRF comme alternative aux techniques spectroscopiques classiques sont la simplicité de préparation de l'échantillon, la vitesse d'analyse, un minimum de manipulations, la rentabilité et l'application à une large gamme d'utilisations telles que la fabrication et le contrôle qualité. Cette méthode d'analyse est plus

particulièrement utilisée dans les mesures de métaux dangereux présents au sein de matériaux et de sols qui peuvent difficilement être déterminées par d'autres techniques.

Les domaines où la technique XRF peut être utile sont évidemment très nombreux et variés. Ils sont regroupés en sept catégories: l'analyse de matériaux (état solide, polymères,...etc.), la biomédecine (échantillons d'origine humaine animale ou végétale), l'archéométrie (objets d'art ou archéologiques), les géosciences (environnement, géologie), les aérosols, les articles techniques et les différentes applications ponctuelles (Azbouche, 2004).

1.1.1. Principe de la technique

Le rayon-X est un type d'ondes électromagnétiques telles que les rayons de la lumière visible, mais la différence principale est sa très courte longueur d'onde (de 100 à 0.1Å). En comparaison aux ondes électromagnétiques normales, les rayons X passent facilement à travers la matière et ils deviennent plus forts lorsque le nombre atomique du matériau diminue. En spectrométrie XRF, les photons primaires des rayons X qui possèdent une haute énergie sont émis à partir d'une source (tube à rayons X) et frappent la substance. Les électrons descouches (orbites) externes K, L ou M vont être excités par l'énergie des photons primaires du tube à rayons X. Dans ce cas, les atomes deviennent des ions, qui sont instables.

Un électron d'une couche externe, L ou M, se déplace dans l'espace nouvellement vacant à la couche intérieure pour rétablir la stabilité. Une énergie connue comme un photon de rayon X secondaire émet quand l'électron de la couche extérieure se déplace dans l'espace interne de la couche. Ce phénomène s'appelle la fluorescence.

L'énergie (E) du photon de fluorescence de rayons X émis est déterminée par la différence des énergies entre la couche initiale et la couche finale des transitions individuelles. Cette opération est décrite par l'équation :

$$E = hc/\lambda$$

où **h**, est la constante de Planck; **c**, est la vitesse de la lumière; et **λ**, est la longueur d'onde du photon.

1.1.2. Les composants de la spectrométrie XRF

La spectrométrie XRF (Fig. 2.1) se compose de trois éléments de base qui affectent les performances et les capacités de la technique. Le premier, correspond à la source d'excitation qui peut être un tube à rayons X (généralement 40-60kV, 50-300W) qui émet un faisceau de rayons X dans l'échantillon en cours d'analyse. Le deuxième, le système de détection qui détecte l'énergie résultante (après avoir excité l'échantillon) qui est caractéristique de l'élément émis en tant que longueur d'onde. Le dernier composant est le système d'analyse, qui est basé sur les algorithmes développés pour des applications spécifiques et qui traite les informations collectées par le système de détection.

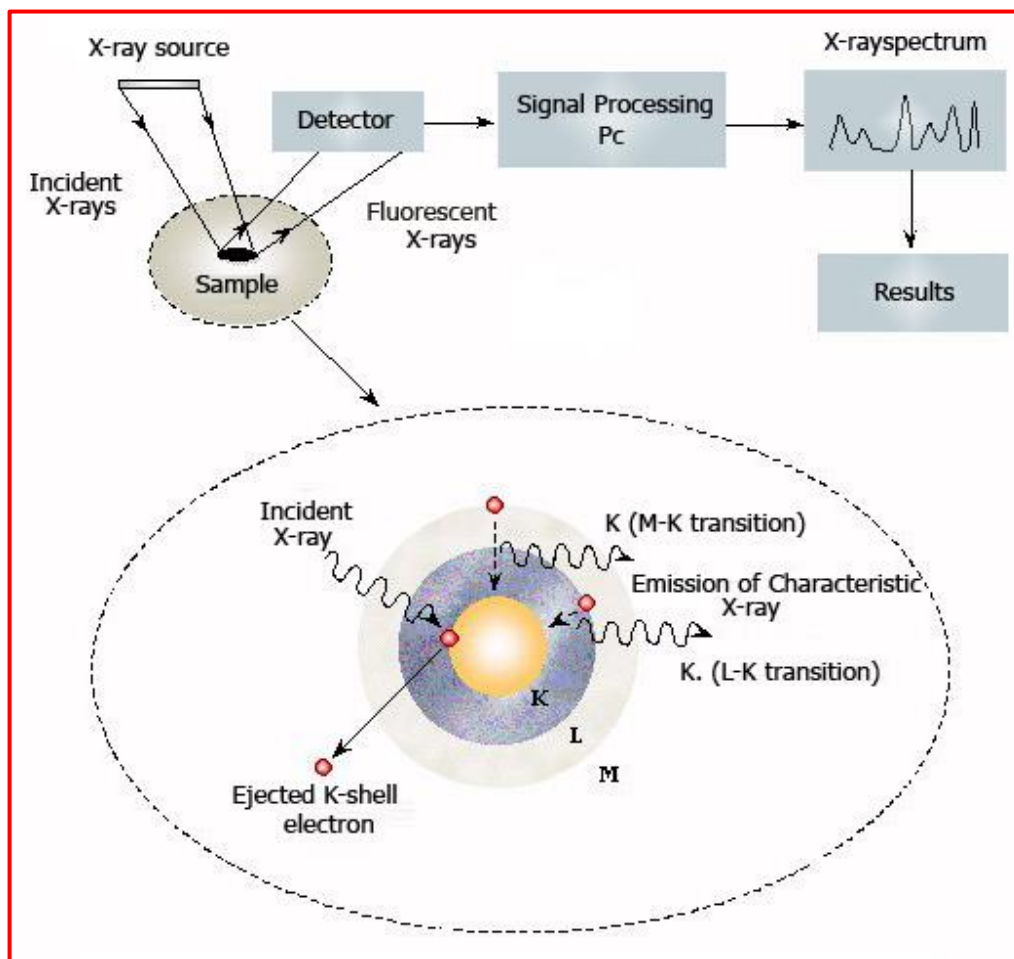


Figure 2.1: Principe et principaux composants de la spectroscopie par fluorescence X (http://omega.physics.uoi.gr/Xrf/english/the_Xrf_technique, 2010).

1.1.3. Forces et limites de la spectrométrie XRF

La fluorescence X est particulièrement bien adaptée pour l'analyse chimique des éléments majeurs (Si, Ti, Al, Fe, Mn, Mg) et des éléments traces (>1ppm; U, V, Y, La, Nb, Ni, Rb, Sc, Zr, Zn, Ba, Ce, Co, Cr, Cu) dans les roches, les sols et les sédiments. La principale faiblesse de l'XRF est que les analyses se limitent généralement à des éléments plus lourds que le fluor. La technique a une sensibilité limitée pour certains éléments et un peu moins de précision et d'exactitude par rapport aux techniques spectroscopiques atomiques (Margui et al. 2009).

En outre, les limites de détection de l'ICP-MS et du GFAAS sont meilleures que celles de la XRF; de plus, elle n'est pas appropriée à la mesure isotopique.

1.2. La spectrométrie de masse à plasma inductif couplé (ICP-MS)

L'analyse ICP-MS nécessite la dissociation de l'échantillon (qui doit être sous forme liquide) en ses atomes ou en ses ions constitutifs. Les ions sont extraits du plasma et passent dans le spectromètre de masse, où ils sont séparés en fonction de leur rapport masse atomique/charge par un quadripôle ou un secteur magnétique. L'échantillon liquide est pompé à 1ml/min dans un nébuliseur, où il est converti en un aérosol fin en présence d'argon à environ 1l/min. Les fines gouttelettes de l'aérosol, qui représentent seulement 1 à 2% de l'échantillon, sont séparées des gouttelettes plus grosses en utilisant une chambre de nébulisation. L'aérosol fin émerge du tube de sortie de la chambre et est transporté dans la torche à plasma *via* un injecteur d'échantillons.

1.2.1. Les composants de l'ICP-MS

Il y a cinq composants de base de l'ICP-MS (Fig. 2.2) :

- Le plasma inductif couplé (ICP)
- L'interface d'échantillonnage
- L'optique ionique de focalisation
- Le spectromètre de masse (MS)
- Le détecteur d'ions

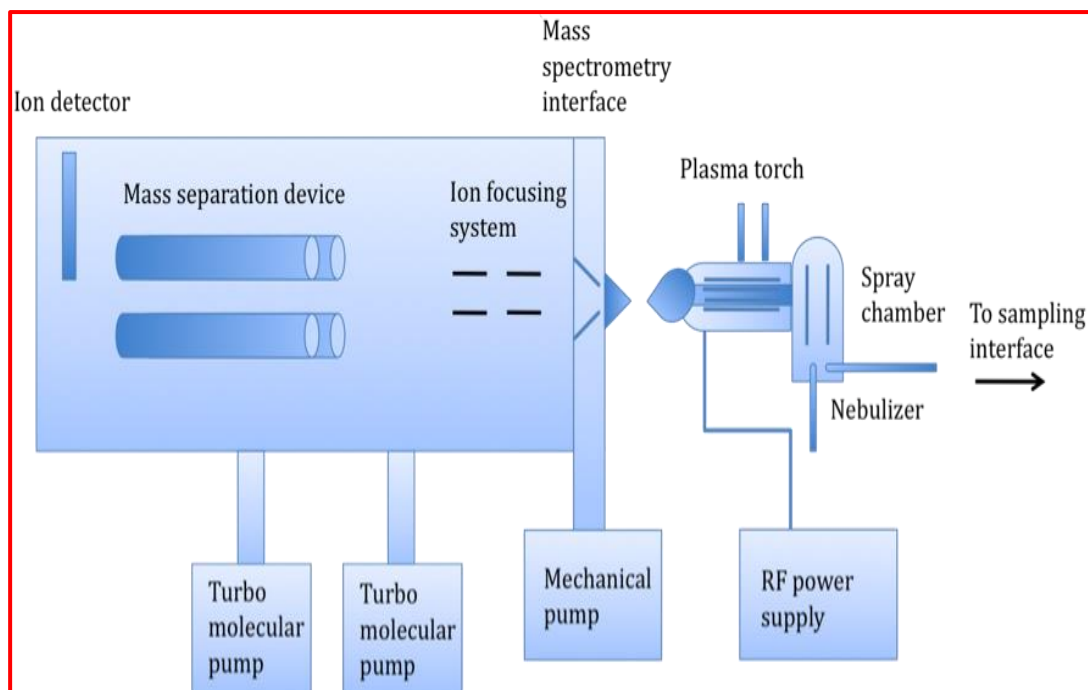


Figure 2.2: Les principales composantes du système ICP-MS (Nelms S., 2005)

1.2.1.1. **Le plasma à inductif couplé (ICP):** Il est la source de chaleur. La gamme de température est de 6000 à 10000K. Cette haute température est nécessaire pour dissocier et exciter l'échantillon afin de former l'ion positif. Si l'échantillon d'intérêt existe sous la forme d'un sel de trace métallique en solution, la première étape est la désolvatation de la gouttelette. Lorsque les molécules d'eau sont éliminées de la gouttelette, celles-ci deviennent une petite particule solide. Quand l'échantillon se déplace dans le plasma, les particules solides passent sous forme gazeuse puis à l'état fondamental. Le processus final de la conversion d'un atome à l'ion est réalisé principalement par des collisions d'énergie électronique d'argon avec les atomes. L'ion est extrait du plasma et est envoyé vers l'interface du spectromètre de masse.

1.2.1.2. **Interface d'échantillonnage:** L'interface d'échantillonnage se situe entre l'ICP et le MS. La torche d'ICP qui est utilisée pour ioniser et atomiser les matériaux a besoin de température de fonctionnement très élevée (environ 7000K). Le spectromètre de masse quant à lui est exploité à la température ambiante et a besoin de vide pour éviter des collisions entre les molécules de gaz avec les ions. Ce processus est accompli par

l'utilisation de l'interface entre la MS et ICP et de pompes à vide pour éliminer les molécules de gaz dans l'espace entre l'interface et le détecteur.

1.2.1.3. **Optique ionique:** L'optique ionique est placée entre le cône de skimmer de l'interface d'échantillonnage et le dispositif de séparation de masse. Le rôle du système d'optique ionique est de capturer des ions provenant du plasma à la pression atmosphérique *via* les cônes d'interface et de les orienter dans l'analyseur de masse, qui est sous vide élevé. Un autre rôle important du système d'optique ionique est d'arrêter les particules, les espèces neutres et de stopper le passage des photons à travers l'analyseur de masse et le détecteur. Ces espèces entraînent une instabilité du signal et contribuent à des bruits de fond qui finalement affectent les performances du système.

1.2.1.4. **Spectromètre de masse:** Il est utilisé pour séparer les isotopes sur la base de leur rapport masse sur charge (m/z). Deux analyseurs de masse sont disponibles pour ICP-MS : (i) le quadripôle, (ii) à secteur magnétique (ICP-MS « haute résolution »). Le type le plus commun d'entre eux est le quadripôle en raison de sa compacité et de sa facilité d'utilisation. L'un des inconvénients du quadripôle est qu'il offre une faible résolution en traitant des ions de même rapport masse sur charge.

1.2.1.5. **Détecteur d'ion:** Le faisceau d'ions séparés par l'analyseur de masse est converti en signal électrique en utilisant un détecteur. Le type le plus commun de détecteur d'ions trouvés dans un système ICP-MS est le multiplicateur d'électrons.

1.2.2. Force et la faiblesse de l'ICP-MS

Les avantages de l'utilisation de l'ICP-MS pour l'analyse des éléments traces sont : la faible limite de détection (ng/l), l'analyse multiélémentaire, la large gamme dynamique, la mesure isotopique, la vitesse d'analyse très élevée, la haute productivité, le faible coût de revient dans le cas de l'analyse de nombreux échantillons, et la facilité d'interprétation des spectres. Les limites de l'utilisation de l'équipement correspondent au coût initial élevé, au besoin de compétences pour le développement de méthodes analytiques et la présence d'interférences spectrales. Le tableau 2.1 illustre la comparaison entre les deux techniques :

Tableau 2.1: Comparaison des techniques élémentaires

Paramètres	XRF	ICP-MS
Sensibilité	Elevée	Très élevée
Limite de détection	µg/l	ng/l
Méthode de préparation des échantillons	Non destructif	Destructif
Gamme dynamique	Large	10 ⁸
Interférences	Très peu	Elevées
Volume d'échantillon requis	Très grand (g)	Très faible
Analyse isotopique	Non	Oui
Facilité d'utilisation	Simple	Modérément simple

1.3. Optimisation de la digestion micro-ondes

La digestion par l'acide est couramment utilisée pour la détermination des éléments traces dans les solides ; elle permet le transfert des échantillons en solution pour pouvoir être quantifiés (e.g. ICP-MS, AAS) sous forme liquide (Pranar et Shankararaman, 2007; Ute et al. 2005). La digestion par l'acide implique l'utilisation d'acides et une phase de chauffage pour détruire la matrice organique et le carbonate lié aux fractions organiques ce qui permet la libération du métal à doser. Dans notre cas, la digestion par l'acide a été effectuée en utilisant de l'eau régale (HCl: HNO₃ 3:1 v/v) et un appareil de micro-ondes pour chauffer l'échantillon.

Le rayonnement de la micro-onde est un rayonnement non ionisant dans la gamme de fréquences de 300 MHz et de 300 000 MHz (Radmila et Blaz, 2003). L'interaction entre l'échantillon et le rayonnement de la micro-onde est due à deux processus (Richter et al. 2001; Pranar et al. 2007). Le premier processus est la rotation dipolaire en fonction du champ électromagnétique oscillant. À 2450 MHz, les dipolaires sont randomisés cinq milliards de fois par seconde. Dans le second processus, le mécanisme de conduction ionique a lieu et fait migrer les espèces ioniques dans la direction du champ électrique. Ces deux procédés produisent une chaleur intense qui rend le processus plus rapide que la convection et la conduction thermique utilisée dans les procédés de chauffage classique. Ainsi, l'efficacité du chauffage dépend de la présence de molécules polaires (par exemple, de l'eau) et des ions dans la composition chimique de l'échantillon (Sturgeon et Willie, 1995; Melaku et al. 2003).

La digestion par les micro-ondes est donc un procédé rapide et efficace de décomposition de l'échantillon à analyser avant la détermination des éléments traces. Les avantages de la digestion par micro-onde sont : une meilleure récupération de l'échantillon, une plus courte durée de l'étape d'extraction et une utilisation de faibles quantités de solvants (Charun et Farmer, 2006; Zlotorzynski, 1995).

1.4. Les sources principales d'incertitudes lors de l'analyse des éléments traces de l'environnement

L'analyse chimique des échantillons de l'environnement peut être divisée en plusieurs étapes : planification de l'analyse, échantillonnage représentatif, préparation des échantillons, mesure instrumentale du signal analytique et enfin acquisition et calcul des données.

La probabilité d'erreur dans l'analyse chimique dépend moins des propriétés physico-chimiques de l'échantillon à analyser que de la gamme de concentrations de la substance dans l'échantillon (Cornelis et al. 2003). Tandis que les concentrations au niveau du pourcentage (%) et de la ppm peuvent souvent être déterminées sans trop de difficulté en routine, la détermination au niveau du ppb et encore plus au niveau du ppt présente un problème.

1.4.1. La collecte et le stockage des échantillons

L'échantillonnage est la première et l'une des étapes les plus importantes dans l'analyse et a pour rôle d'assurer la représentativité de l'échantillon dans le contexte étudié. Pour cette raison, il représente la source la plus importante d'erreurs. L'échantillon représentatif, est celui qui est réparti uniformément sur la zone étudiée. L'un des problèmes lors d'une l'analyse de sol vient du fait que l'échantillon de départ peut correspondre à une masse de quelques kilogrammes à plusieurs tonnes et que seulement quelques centaines de milligrammes seront utilisés dans l'équipement analytique pour l'analyse réelle (Baffi et al. 2002).

En d'autres termes, il existe une réduction très importante en masse de l'échantillon d'origine à l'échantillon utilisé pour la mesure. Néanmoins, on doit s'assurer que l'échantillon utilisé dans l'analyse a la même composition chimique que l'échantillon initial. Selon les échantillons à analyser et les éléments à déterminer, les outils de prélèvement, les dispositifs de filtration et de stockage doivent être choisis avec précaution pour minimiser les risques de contamination possible (Zoltan et Ralph, 2004). Toutes les verreries qui seront utilisées doivent donc être lavées, rincées puis trempées une nuit dans 1-10% (v/v) d'acide nitrique. Enfin, toutes les verreries doivent être rincées à l'eau déminéralisée de haute pureté et séchées avant utilisation.

La collecte et le stockage des échantillons sont associés au risque de contamination, en particulier lorsque le prélèvement est à faire avec une faible quantité d'échantillon où se trouve de faibles teneurs en éléments à analyser (Hoenig, 2001). Afin de minimiser les pertes de substance par adsorption d'ions métalliques sur le récipient ou sur les particules en suspension, les échantillons recueillis comme l'eau poreuse des sols peuvent être stockés à 4°C pour une courte période dans un réfrigérateur ou à 20°C dans un congélateur pour des périodes plus longues.

Dans le même but, les solutions aqueuses sont généralement acidifiées (à un pH de 1.5 avec de l'acide nitrique) après l'échantillonnage et la filtration (Markert, 1995). Ce traitement est généralement suffisant pour éviter l'adsorption des éléments traces sur les parois du récipient dans le cas d'un stockage de longue durée. Un autre moyen d'éviter les pertes d'adsorption est la congélation immédiate de l'échantillon prélevé et sa décongélation juste avant les mesures. C'est la meilleure méthode pour le stockage des eaux naturelles, car une acidification peut mobiliser en solution certains éléments traces associés à des particules présentes dans l'échantillon.

1.4.2. Préparation de l'échantillon

Dans l'analyse des échantillons environnementaux, la source d'erreur la plus courante correspond aux étapes de préparation. La préparation des échantillons est la partie la plus critique de l'analyse, car elle est responsable de la plupart des sources d'erreurs cachées. Ces erreurs dues principalement à des contaminations peuvent généralement être surmontées si des précautions sont prises en ce qui concerne : le choix des réactifs, le matériel utilisé et la procédure de travail.

Le choix de la procédure de préparation de l'échantillon dépend de la technique de mesure utilisée. La préparation des échantillons implique plusieurs étapes. Pour les sols ou les végétaux, ces étapes incluent le séchage (à l'air libre, dans un four ventilé entre 39 et 42°C), l'homogénéisation (mélange), le broyage (mortier), le sub-échantillonnage, la minéralisation et enfin la dissolution de l'échantillon.

La plupart de ces étapes effectuées en laboratoire peuvent être des sources de contaminations, essentiellement en raison du type de verrerie et de la pureté des réactifs utilisés. Le séchage protège le matériau de l'échantillon contre la décomposition microbienne au cours du stockage ultérieur. Les échantillons qui ne peuvent pas être séchés immédiatement peuvent être conservés dans un réfrigérateur à 4°C avant d'être traités (Dean, 1998). Pour obtenir un échantillon représentatif et augmenter l'aire de surface de l'échantillon,

l'échantillon solide doit être divisé en parties plus petites en appliquant une force mécanique. La taille de l'échantillon peut être réduite par broyage. Le broyage généralement appliqué à des échantillons solides avant la procédure de dissolution peut contaminer l'échantillon par l'abrasion des parties du mortier (Arabinda et al. 1995).

Les étapes de préparation des échantillons nécessitent d'utilisation de réactifs et de récipients fabriqués en porcelaine, verre, quartz, platine ou en matières plastiques. Les impuretés présentes dans les réactifs sont d'importantes (et souvent systématiques) sources de contaminations, en particulier si elles sont ajoutées en grandes quantités. La dissolution totale des sols ne peut être atteinte en une seule étape en utilisant un seul réactif. Dans la pratique, un certain nombre d'étapes et de réactifs est dictée par la composition chimique et la minéralogie de la matrice. La dissolution incomplète de l'échantillon en raison du mauvais choix de réactifs peut également induire une erreur systématique sur les mesures (Dean, 2005).

Le bon choix de la procédure de préparation de l'échantillon, la qualité de son application et un environnement de laboratoire approprié sont les points les plus importants à prendre en compte pour la réussite d'une analyse des éléments traces métalliques.

Selon l'instrument de mesure, l'échantillon peut être introduit soit sous forme solide ou liquide. Très peu de techniques permettent à des échantillons solides d'être introduits directement dans l'instrument pour une analyse; par conséquent l'analyse d'échantillons solides implique une mise en solution.

2. Les sites d'étude

Dans ce travail, les différentes problématiques liées à la présence de technosols contaminés en ETM ont été étudiées sur deux sites. Nous avons étudié la spéciation chimique, la mobilité et la phytodisponibilité de ces ETM.

Le premier site est localisé dans le département du Nord à la frontière Franco-Belge, dans la plaine alluviale de la Scarpe et de l'Escaut. Il s'agit d'un terrain d'alluvions fluviales relativement peu perturbé. Ce site est adjacent à un ancien complexe industriel qui se composait d'une zinguerie, d'une usine de production de plomb et d'une unité de production d'acide sulfurique (Fig. 2.3). Il présente des contaminations importantes en zinc, plomb et cadmium dues à la dispersion par voie atmosphérique de cendres et de poussières de scories lors de l'activité de l'usine ainsi qu'à la réutilisation plus ponctuelle de scories et de divers déchets issus des procédés de fabrication mis en œuvre (Thiry et van Oort, 1999). Une végétation métallophyte très spécifique s'y est développée (*Arabidopseshallari* et *Avena sativa* L., *Cardaminopsis halleri* et *Agrostis tenuis*).

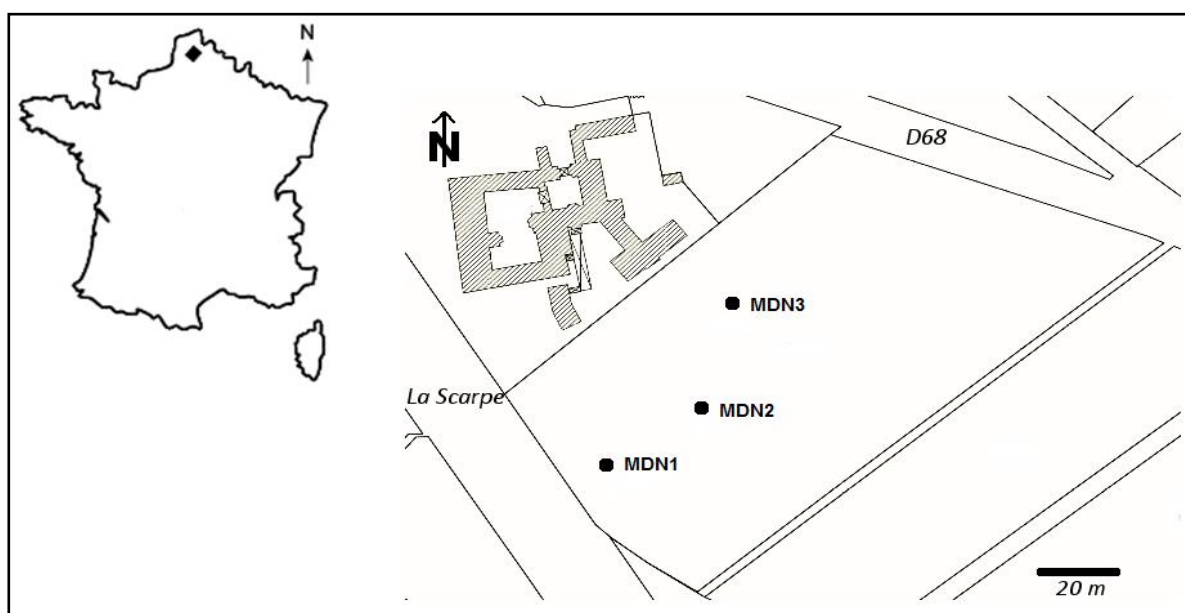


Figure 2.3: Localisation et plan descriptif du site de Mortagne-du-Nord montrant les différents lieux d'échantillonnage des sols étudiés.

Le deuxième site est un ancien site minier présentant des sols développés au sein d'un bassin de décantation d'une ancienne mine d'or sur des résidus miniers (Fig. 2.4) (Wanat, 2011), situé au lieu-dit La Petite Faye à 60 km au nord de Limoges dans le département de la Creuse (France, coordonnées GPS : 01°34'23''E de longitude et 46°08'37''N de latitude). Cette mine n'est plus en activité depuis 1964 et a produit environ 34 000 tonnes de déchets miniers qui ont été déversés dans un bassin de décantation d'environ 12 000 m² sur une hauteur supérieure à 3m. Le site présente actuellement une végétation composée principalement de graminées, de quelques bouleaux (*Betula pendula*), de fougères (*Pteridium aquilinum*) et de prêles géantes (*Equisetum telmateia*).

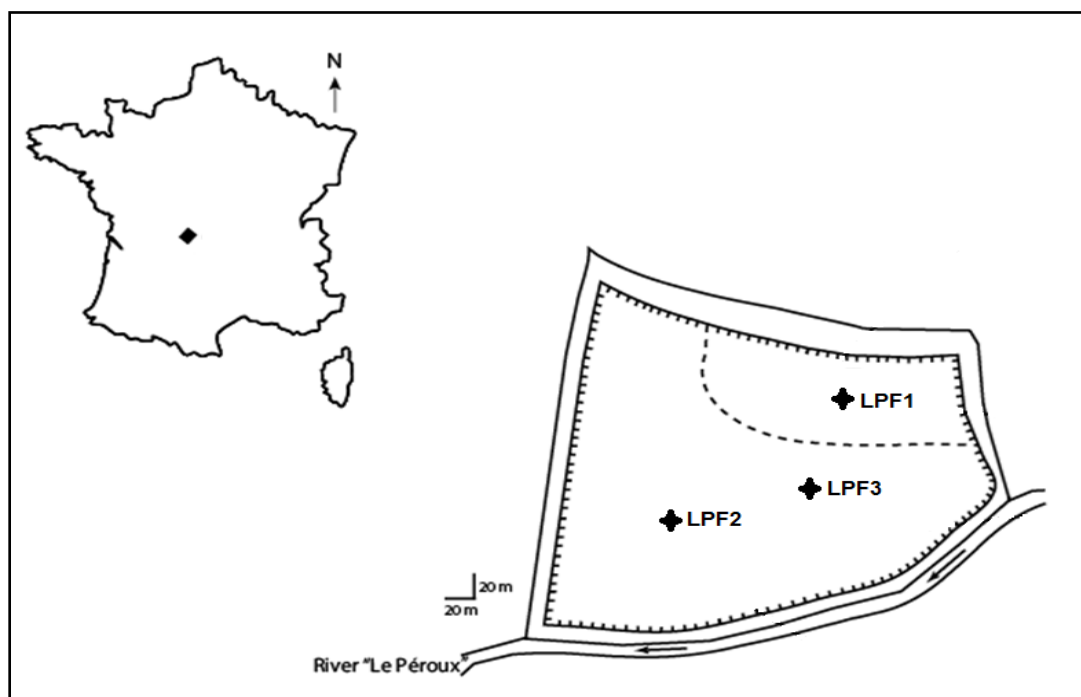


Figure 2.4: Localisation et plan descriptif du site de La Petite Faye montrant les différents lieux d'échantillonnage des sols étudiés.

Notre étude a porté sur des échantillons provenant principalement de trois emplacements de chaque site nommés MDN1, MDN2, MDN3 et LPF1, LPF2 et LPF3 respectivement. Ils sont caractérisés par une forte concentration en métaux et métalloïdes (Zn, Pb, Cd, As, Pb et Sb) et diffèrent de part le type de végétation et la concentration totale dans le sol en ETM.

Chapitre 3

Spéciation, mobilité et phytodisponibilité des éléments traces métalliques

Ce chapitre présente les résultats obtenus sur les deux sites décrits dans le chapitre deux, le site de Mortagne-du-Nord (MDN) et le site de La Petite Faye (LPF). Ces deux sites sont contaminés par une forte concentration en éléments traces métalliques (Zn, Pb, Cd, As et Sb). Sur les sols de surface prélevés de ces deux sites, la technique d'extraction séquentielle et partielle ainsi que la technique utilisant le gradient diffusif en couche mince (*Diffusive Gradients in Thin films* (DGT)) en combinaison avec des tests de germination (haricots nains) au laboratoire ont été appliquées pour étudier la spéciation chimique des principaux ETM et pour déterminer leur mobilité ainsi que leur phytodisponibilité.

Nos résultats sont présentés sous forme d'articles (publiés ou soumis). Les résultats sont exposés en fonction des sites d'études et des techniques appliquées sur les sols de ces sites contaminés en éléments traces métalliques.

Les chapitres **3.1, 3.2 et 3.3** présentent les résultats obtenus sur l'application des techniques mentionnées ci-dessus et appliquées sur les deux sites.

Ce chapitre est subdivisé en trois sous-chapitres :

Chapitre 3.1 : Fractionnement des éléments potentiellement toxiques dans les technosols à l'aide de deux techniques d'extraction séquentielle.

Chapitre 3.2 : Évaluation de la phytodisponibilité des éléments potentiellement toxiques dans les technosols d'anciennes zones minières et industrielles.

Chapitre 3.3 : Utilisation de gradients diffusifs en couches minces, mesure des ETM dans l'eau interstitielle du sol et dans les plantes indicatrices afin de prédire la phytodisponibilité d'éléments potentiellement toxiques dans des technosols contaminés.

Chapitre 3.1

Fractionnement des éléments potentiellement toxiques dans des technosols à l'aide de deux techniques d'extraction séquentielle

Résumé de l'article 1

Les chimistes, biochimistes et biologistes portent un intérêt particulier à la spéciation chimique des éléments potentiellement toxiques (EPT) car leur biodisponibilité et toxicité sont fortement dépendantes de la forme chimique de l'élément concerné. En particulier l'étude de la toxicité des métaux et métalloïdes présents à l'état de traces dans un sol passe donc par la connaissance de leur spéciation chimique.

Le but de cet article est l'étude de la spéciation chimique de Zn, Pb, Cd, As, et Sb dans deux technosols contaminés issus de sites post-industriels et miniers afin de déterminer la distribution de ces éléments dans les différentes fractions du sol. Nous nous sommes également intéressés à la sélectivité d'extraction de différents protocoles utilisés.

Les échantillons de sols de surface ont été collectés sur deux sites contaminés : l'un est un technosol développé à partir de déchets d'un ancien complexe industriel qui se composait d'une zinguerie et d'une usine de production d'acide sulfurique situé à Mortagne-du-Nord (MDN) (France), et l'autre est un technosol développé à partir des déchets miniers d'une ancienne mine d'or située près de Limoges au lieu-dit de La Petite Faye (LPF) (France).

Pour réaliser l'objectif de notre travail, 3 échantillons de sols de surface (horizon 0-20 cm) pour chaque site (nommés MDN1, MDN2, MDN3, et LPF1, LPF2, LPF3) respectivement pour MDN et LPF, ont été collectés (0-20 cm de profondeurs, séchés à l'air et tamisés à 2mm) selon un gradient de contamination métallique. Deux schémas d'extraction séquentielle (le schéma de Tessier et le schéma BCR modifié) ont été utilisés pour étudier la spéciation chimique des EPT.

Nos résultats ont montré que le Zn, Pb et Cd pour le site MDN sont principalement associées à la fraction acide soluble et réductible, alors que l'As, Pb et Sb pour le site LPF sont associés à la fraction résiduelle. De plus les pourcentages des EPT dans la fraction liée aux oxydes de Fe-Mn déterminés par le schéma de Tessier étaient plus élevés que ceux déterminés par le schéma BCR modifié. Les pourcentages des EPT dans la fraction organique déterminés par le schéma de Tessier étaient également plus élevés que ceux déterminés par le schéma de BCR modifié.

Finalement nous pouvons dire que les EPT sont distribués dans toutes les fractions du sol, avec les enrichissements les plus importants dans les fractions acides solubles et résiduelles. Une quantité significative de Cd, Pb et Zn est cependant assez mobile, ce qui suggère que ces éléments peuvent être facilement disponibles pour les plantes et les organismes du sol.

Article 1: Published in

(J. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21: 5054 – 65)

Potentially toxic elements fractionation in technosols using two sequential extraction schemes

Bashar Qasim^{1,2,*}, Mikael Motelica-Heino¹

¹CNRS/ISTO Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, UMR-CNRS 7327 Campus Géosciences, Université d'Orléans, 1A rue de la Férollerie, 41071 Orléans, France.

²Applied Sciences Department, University of Technology, Baghdad, Iraq.

Abstract

This study reports the chemical fractionation of several potentially toxic elements (Zn, Pb, Cd, As, and Sb) in contaminated technosols of two former smelting and mining areas using two sequential extraction schemes. The extraction schemes used in this study were the Tessier's scheme and a modified BCR scheme. The fractions were rearranged into four equivalent fractions defined as acid soluble, reducible, oxidisable, and residual to compare the results obtained from two sequential extraction schemes. Surface soils were samples from metallophyte grassland contaminated with Zn, Pb, and Cd located at Mortagne-du-Nord (MDN; North France) and from a settling basin contaminated with PTE such as As, Pb, and Sb located at La Petite Faye (LPF; Limoges, France). The study of the Zn, Pb, Cd, As, and Sb partitioning in the acid soluble, reducible, oxidisable, and residual fractions of the technosols revealed that Zn, Cd, and Pb were mainly associated with the acid soluble and reducible fractions for MDN site, while As, Sb, and Pb were associated with residual fraction for LPF site. Fractionation results indicate that the percentages of Zn, Pb, Cd, As, and Sb extracted in Fe–Mn oxide bound fraction of Tessier's scheme were always higher than those extracted by modified BCR scheme. This may be attributed to the stronger Tessier's scheme conditions used to extract this fraction. In contrast the percentages of Zn, Pb, Cd, As, and Sb extracted in the organic fraction of the modified BCR scheme were always higher than those of the Tessier's scheme. The order of mobility of PTE was as follows: Cd > Zn > Pb in MDN site and

As > Sb > Pb in LPF site. PTE were distributed in all soil fractions, with the most relevant enrichments in extractable and residual fractions. A significant amount of Cd, Pb, and Zn were rather mobile, which suggests that these elements can be readily available to plants and soil organisms.

Keywords: Potentially toxic element fractionation, Sequential extraction, Mining and smelting activities, contaminated technosols

1. Introduction

Mining and smelting activities are considered as highly polluting sources of potentially toxic elements (PTEs) in the environment (Shu et al. 2001; Schuwirth et al. 2007). In fact both mining and smelting processes produce large amounts of wastes resulting in soil contamination (Davies 1983; Adriano 2001). These processes introduce PTE into the environment through gaseous and particulate emissions but also liquid and solid wastes (Dudka and Adriano 1997). The exposure of the population to these PTE involves a risk to human health by consuming the plants grown on the contaminated sites (Nabulo et al. 2010).

Since the determination of the total concentration of PTE in soils does not give sufficient information about the mobility and toxicity of these elements (Nowak 1995; Szulczewski et al. 1997; Rauret 1998; Petit and Rucandio 1999), additional information on the concentrations of particular physicochemical forms of the PTE is in fact required as their behavior in the environmental system depends on their chemical speciation (Merian and Clarkson 1991; Rodriguez et al. 2009).

The speciation can be defined as the identification and quantification process of different species or binding forms in which an element occurs (Ure et al. 1995; Ure and Davidson 2001). PTE in soils are partitioned between the different phases present, i.e., organic matter, oxyhydroxides of iron, aluminum and manganese carbonates, sulfides, clays, etc., and are retained on these solid phases by different mechanisms, i.e., ion exchange, complexation, precipitation or co-precipitation (Weber 1991; Benedetti et al. 1995), or are retained in the lattice of soil minerals. Since the behavior of PTE in the soil–water–plant system depends on their speciation, the determination of PTE partition in soils assessed by sequential extraction schemes can give useful information. Different extraction schemes have been widely used to mimic differing environmental conditions, with strong acids being used to determine the total concentration of PTE and weaker

solutions to determine compounds that are relatively soluble and bioavailable (Anju and Banerjee 2010).

The main goal of sequential extraction is to convert PTE bound in the different solid phases into soluble forms with a specific chemical extractants used at each step (Tokalioglu et al. 2000a, b). In these sequential extraction schemes, a series of progressively harsher reagents is used to dissolve increasingly refractory forms of these elements, from the more mobile to the more refractory (MacLaren and Crawford 1973; Shuman 1985).

However, sequential extraction schemes are greatly influenced by experimental factors such as the choice of chemical reagents, specific extraction time, and weight ratio of sample to volume of the extraction solution. Thus, there are many criticisms of these schemes as several operationally defined artifacts may occur including the lack of specificity of reagents, the possibility of re-adsorption of released PTE to the remaining fractions (Belzille et al. 1989; Hass and Fine 2010) and the potential alteration of other phases during one extraction step (Li and Thornton 2001).

The best-known sequential extraction scheme (Tessier et al. 1979) consists of five steps in which PTTE are considered to be distributed among different soil fractions: (1) exchangeable, (2) bound to carbonate, (3) bound to Fe–Mn oxides, (4) bound to organic matter, and (5) residual. Many sequential extraction schemes derived from the Tessier one have been applied to soils and sediments to fractionate PTE by using different chemical extractants to obtain useful information about the bioavailability and mobility of these elements (Elliott et al. 1990; Krishnamurti et al. 1995) in particular, one of the Community Bureau of Reference (BCR) (Ure et al. 1993) which is similar to that produced by Tessier et al. with the main difference in the first extraction step of the scheme.

The aims of this work was thus to: (1) investigate the chemical fractionation of PTE, respectively Zn, Pb, and Cd, in contaminated surface technosols from a former smelting site (Mortagne-du-Nord (MDN), France) and As, Pb, and Sb from a former mining site (La Petite Faye (LPF), Limoges, France), and (2) compare the efficiency and suitability of two sequential extraction schemes (Tessier and a modified BCR) for these soils.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling

Two sites have been selected for this study, the first one is metallophyte grassland located in Mortagne-du-Nord (MDN) in Northern France. This area is adjacent to the former metallurgical site occupied for over 60 years by a Zn smelter unit linked to a sulfuric acid production unit and a Pb smelting unit (Thiry and van Oort 1999). The second site is the former mine tailing of La Petite Faye (LPF) located 60 km North-East of Limoges (France), where mining wastes have been stored in a settling basin from 46 years ago. The main PTE present in soils are As, Pb and Sb (Néel et al. 2003; Nénert et al. 1997).

Three locations from each site named (MDN1, MDN2, MDN3) and (LPF1, LPF2, LPF3) respectively were selected according to the level of PTE concentrations and spatial distribution of the vegetation cover. Surface soils (0-20 cm) were sampled from each location with a stainless steel spade. In the MDN site the vegetation cover consists of essentially *Arabidopses hallari* and *Avena sativa* L. whereas, in LPF site, *Graminea*, *Equisetum telmateia*, *Betula pendula* and *Pteridium aquilinum* were present with large horsetails of black alder and poplar (Dutreuil et al. 1997).

All soil samples collected were carefully transferred to clean polyethylene bags before transport to the laboratory. Collected soil samples were oven-dried at a constant temperature of 40°C, manually homogenized and then quartered. Two equivalent fractions were obtained from each quartered sample. One fraction was used for the determination of the soil physico-chemical properties whereas the other fraction was used for chemical analysis of PTE. Samples for chemical analysis were sieved first using a 2mm mesh sieve, to remove gross plant matter and subsequently crushed to pass through a 250µm sieve (Brooks 1983).

2.2. Reagents and standards

All the reagents used to prepare the extracting solutions were products of analytical-grade quality (Merck pro-analysis, Darmstadt, Germany). All solutions and dilutions were prepared using doubly deionized water ($18.2\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$) (Thermo Scientific Barnstead Easy pure II systems). Standard stock solutions of 1000mg l^{-1} of different elements were prepared from metal wires or salts of purity higher than 99.998% (VWR international, BDH Prolabo ICP Standards, Belgium). Diluted standard working solutions were prepared from these on a

daily basis. All laboratory glassware and plastic ware were rinsed three times with double deionized water after being soaked in a HNO_3 (10%, v/v) bath for 24h.

2.3. Analysis of the soil physico-chemical properties

Physico-chemical properties of the samples (<2mm fraction) were characterized by routine soil testing laboratories according to standardized French (AFNOR 1999) or international (ISO 1999) procedures (Table 3.1.3). pH and EC of each samples were determined in distilled water extracts (1:2.5 w/v) (NF ISO 10390 (2005)). Total organic carbon concentrations were determined according to ISO (1999). Cation exchange capacity (CEC) was determined by the 0.05N cobalthexamine method (Aran et al. 2008). Organic matter was determined according to (Storer 1984) procedure depends on loss of weight on ignition (LOI).

2.4. X-ray fluorescence spectrometer (XRF)

The total concentration of PTE in the contaminated soil samples was determined from X-ray fluorescence using a XMET 5100 X-ray spectrophotometer (Oxford Instruments Analytical GmbH, Germany). PTE in the soil were determined by XRF method by pressed soil pellets with an acquisition delay time of 3 min. for each sample.

2.5. Soil mineralogical characterization

Powder X-ray diffraction was used for mineralogical characterization in bulk studied soils using a diffractometer INEL XRM3000 montage transmission (geometry Debye-Scherrer), ($\text{CoK}\alpha$, 40 kV, 30mA) between 5 to $90^\circ 2\theta$. The analyses of minerals were carried out on thin section of the bulk sample using INEL diffractometer equipped with an INEL CPS 120 detector (Debye-Scherrer geometry).

2.6. Sequential extractions

Sequential extraction schemes of Tessier et al. (1979) and of the European Union's Standards, Measurements and Testing Program (SM&T) (Sahuquillo et al. 1999) were used in this study and are summarized in (Table 3.1.1 and 3.1.2) respectively. Each extraction step was performed in triplicate, starting with 1g of original soil material. The aqua regia step performed on the residue from step 4 for (Tessier's scheme) or step 3 for (BCR scheme) was based on the ISO 11466 method (ISO norm 11466 (1995)).

Metal concentrations in all extracts from these sequential extraction schemes were determined by ICP-MS (Finnigan Element XR, Thermo Electron, Germany). Additionally blanks of the different extractants were analyzed in triplicate and further subtracted from the soil samples. The accuracy of the sequential chemical extraction scheme was determined by comparing the sum of the concentrations obtained at the different steps of the extraction scheme with total metal content (Cuong and Obbard 2006).

Table 3.1.1: Extraction conditions of the Tessier's scheme

Fraction	Extractants and conditions
Exchangeable	1M MgCl ₂ (pH=7), 20ml, 1h.
Bound to carbonate	1M NaOAc (pH=5), 20ml, 1h.
Reducible	0.04M NH ₂ OH.HCl, 20ml, 95°C, 6h.
Oxidisable	15ml 30% H ₂ O ₂ and 3ml 0.02M HNO ₃ , 2h, 85°C, 3.2M NH ₄ OAc, 5ml, 85°C, 3h.
Residual	HF, HClO ₄ , HNO ₃

Table 3.1.2: Extraction conditions of the modified BCR scheme

Fraction	Extractants and conditions
Exchangeable	0.11M CH ₃ COOH, 40ml, 16h.
Reducible	0.1M NH ₂ OH.HCl (pH=2), 40ml, 16h.
Oxidisable	8.8M H ₂ O ₂ , 10ml, 85C, 1h.and8.8M H ₂ O ₂ , 10ml, heated to dryness, and 1M NH ₄ OAc
Residual	Aqua regia (ISO 11466 (1995))

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical properties of the studied soils

The main physico- chemical properties of the soil samples are summarized in (Table 3.1.3). The pH of MDN soils was slightly acid and ranged from 6.14 to 6.92, while the pH of LPF soils was acidic to slightly acid and ranged from 3.65 to 5.75, this could be because of the acid forming process occurring during mine tailing weathering producing acid mine drainage leading to the increase in hydrogen ion activity.

Organic matter ranged from 8.26 to 13.84% and from 5.27 to 6.83% for MDN and LPF respectively. Organic carbon of both MDN and LPF ranged from 3.35 to 6.45% and 0.3 to 1.67% respectively. Total PTE concentrations for MDN site were as follows: Zn (3111- 7721 mg kg⁻¹), Pb (879 – 3558 mg kg⁻¹) and Cd (53 – 72 mg kg⁻¹), while, total PTE concentrations for LPF site were as follows: As (2677 – 83937 mg kg⁻¹), Pb (362 – 16100 mg kg⁻¹) and Sb (100–871 mg kg⁻¹).

Table 3.1.3: Physico-chemical characteristics of the soils and PTE total concentrations of the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) and La Petite Faye (LPF).

Sample	pH	EC ($\mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$)	TOC %	CEC c mol.kg ⁻¹	Zn	Pb	Cd
					mg kg ⁻¹		
MDN1	6.92	112	3.35	7.2	7721	3558	72
MDN2	6.35	112	4.39	8.5	3111	876	63
MDN3	6.14	113	6.45	6.7	3124	879	53
					As	Pb	Sb
					mg kg ⁻¹		
LPF1	3.65	258	0.3	18.3	83937	16100	871
LPF2	4.93	200	0.47	39.7	37458	8536	498
LPF3	5.75	150	1.67	29.1	2677	362	100

EC: electrical conductivity, OM: organic matter, TOC: total organic carbon, CEC: cation exchange capacity.

The concentrations of Zn, As and Pb are greater than: (i) the possible toxicity values (10 – 300, 5–20 and 30–300 mg kg⁻¹, respectively (Kabata-Pendias 2001; Kiekens 1995; McGarth and Loveland 1992) and (ii) the normal background levels given (e.g. 1 – 50 mg kg⁻¹ for Zn, 1–30 mg kg⁻¹ for As and 9–50 mg kg⁻¹ for Pb (Wilson et al. 2010) for soils of diverse origins and lithologies throughout the world.

3.2. Soil mineralogical composition

As derived from the XRD analysis, there are no significant differences in mineralogical composition between the different soils samples are found for the LPF site. Surface soils in the studied former mining area are mainly constituted by silicate species such as quartz, muscovite, clinoclore, and feldspar together with clay minerals such as illite, kaolinite and chlorite. The MDN surface soils are mainly constituted by quartz, muscovite, albite, dolomite, orthoclase and calisite.

3.3. Fractionation of the PTE

Results of the PTE fractionation in the studied soils for the different samples for the two sequential extraction schemes are shown in (Fig. 3.1.1 and 3.1.2). The results of metal fractionation in different operationally defined “equivalent” solid phase fractions as obtained by the two schemes are summarized in (Tables 3.1.4 and 3.1.5). In Tessier' scheme, the equivalent fraction used were T1 (Exchangeable fraction), T2 (Bound to carbonate), T3 (reducible (Fe-Mn oxide bound) fraction), T4 (oxidisable (organic/sulphide) fraction) and T5 (residual fraction). Whereas, in modified BCR scheme, the equivalent fraction used were B1 (acid soluble (carbonate bound) equivalent to (T1+T2)), B2 (reducible (Fe-Mn oxide bound) fraction equivalent to T3), B3 (oxidizable (organic/sulphide) fraction), equivalent to T4) and B4 (residual fraction, equivalent to T5).

3.3.1. MDN site

Zinc

Tessier's extraction scheme showed that Zn recovery was between 95.7% and 98.4% for all studied samples which can be regarded as acceptable in comparison with other studies (Hongyu Liu 2005; Rodriguez 2009). Zn was mainly associated with carbonate fraction and accounted for 38.2%, 31.1% and 30.3 % of total Zn for MDN1, MDN2 and MDN3

respectively (Fig. 3.1.1a). The concentration of Zn in reducible fraction ranged from 25.8 to 28.3% of total Zn for all samples. On average, the concentration of Zn in exchangeable fraction accounted for 17– 21.7% and in residual fraction 14.3– 17.2% for all studied samples. Data in (Fig. 3.1.1a) indicate that general distribution of Zn into the various fractions for all studied samples followed the order: $T_2 > T_3 > T_1 > T_5 > T_4$. This observation is in agreement with that of Pardo et al. (1990).

BCR extraction scheme showed that Zinc recovery was ranged between 96.1% and 99.7% for all studied samples. Zn distribution pattern in each fraction followed the order: $B_1 > B_2 > B_4 > B_3$ (Fig. 3.1.2a). About 53.4%, 42.2% and 48.8% of total Zn occurs in soluble fraction (B_1) for MDN1, MDN2 and MDN3 respectively. About 21.2 – 26.1% is distributed in reducible fraction, 18–20 % is incorporated into silicate lattice, while fraction of Zn bound to oxidisable fraction represents less than 11% of total Zn for all studied samples. The first extraction step (B_1) is important for this metal. A possible explanation for this is the presence of calcareous minerals, which act as a strong adsorbent for Zn in mine tailings (Anju 2010; Nannoni et al. 2011).

Collectively, both extraction schemes gave similar results for Zn. In fact the relative Zn associations, as provided by both extraction schemes are similar for all four equivalent fractions (i.e. acid soluble > reducible > residual > organic/sulphide bound) for all studied samples. Zn fractionation is dominated by acid soluble fraction. However it was observed that the amount of Zn extracted in acid soluble fraction by BCR scheme was higher than Tessier's scheme, as more Zn was extracted in (B_2) by BCR scheme than by Tessier's scheme (T_3).

Lead

Lead recovery in Tessier's extraction scheme ranged between 92% and 110% for all studied samples. The relative distribution of Pb among different fractions in MDN1 followed the order: $T_2 \approx T_3 > T_4 > T_5 > T_1$ (Fig. 3.1.1b). It can be seen that Pb was mainly associated with carbonate and reducible fractions accounting for 31.4% and 30.8% respectively of total Pb content. Pb in MDN1 is shown to be strongly associated with carbonate fraction. This is coherent with thermodynamic prediction (Brookins 1988) that cerussite ($PbCO_3$) would be the dominant lead mineral at the Eh–pH conditions of mine tailing. Additionally $CaCO_3$ may act as a strong adsorbent for Pb and could complex Pb as ($PbCO_3$) (Li and Thornton 2001). The next Pb fractions were oxidisable and residual which represents <18% and <15% respectively.

The fractionation pattern of Pb in both MDN2 and MDN3 was: $T_3 > T_2 > T_4 > T_5 > T_1$. This was comparable for these samples, demonstrating that Fe-Mn oxide bound fraction

(42.9%) for MDN2 and (32.8%) for MDN3 is the predominant fraction. Fe–Mn oxides are in fact important scavengers of metals in soils particularly at a high pH range (pH >7.0) (Tipping et al. 1986). The remaining Pb content was distributed among carbonate, oxidisable and residual fractions represents <29%, <13% and <10 for MDN2 and <21%, <26% and <13% for MDN3 respectively.

BCR extraction scheme showed a percentage recovery for Pb ranging between 97% and 113% for all studied samples. Pb association in MDN1 followed the order: B1>B2>B3>B4 (Fig. 3.1.2b), indicating that highest percentages of Pb were associated with acid soluble (32.6%), Fe-Mn oxide bound (28.9%), organic/sulphide (27.2%) and residual fraction (11%). In contrast Pb distribution among different fractions in MDN2 and MDN3 followed the order: B2>B3>B1>B4, indicating the relative importance of Fe-Mn oxide bound (33.7% and 30.6%) and organic/sulphide fraction (31.1% and 30.1%) for both MDN2 and MDN3 respectively. This finding is in agreement with that of Ramos et al. (1994); Romaguera et al. (2008); Zemberyova et al. (2006).

Fractionation results obtained for Pb from the two extraction schemes were also similar for all studied samples. The relative distribution of Pb in all four fractions was also similar. The most abundant fractions were acid soluble and Fe-Mn oxide bound. Again, a higher amount of Pb was extracted with reducible fraction by Tessier's extraction scheme compared to BCR scheme. In contrast for organic/sulphide bound fractions it was the opposite.

Cadmium

Cd recovery in Tessier's extraction scheme was ranged between 84% and 105% for all studied samples. The fractionation of Cd in each fraction followed the order: T1>T5>T3>T2>T4 (Fig. 3.1.1c) for MDN1 and MDN2, while it followed the order: T1>T2>T3>T4>T5 for MDN3, matching the usual distribution of this element in contaminated soils (Narwal et al. 1999; Sanchez et al. 1999; Kaasalainen and Yli-Halla, 2003). Soil Cd was mainly associated with exchangeable fraction representing about 46.1%, 46.1 % and 37.64 % of total Cd for MDN1, MDN2 and MDN3 respectively. This fraction includes Cd held by electrostatic adsorption and specifically adsorbed. This fraction may be also called easily soluble and/or exchangeable.

This form of Cd is considered more mobile and phytoavailable (Dudka and Chlopecka 1990). It can be seen that for the non- exchangeable fraction, the highest percentage of Cd 22.3% and 23.9% in MDN1 and MDN2 was associated with residual fraction followed by Fe-Mn oxide bound, carbonate bound and organic/sulphide fractions whereas, in MDN3, the

fractionation pattern revealed that Cd was most abundant in carbonate bound fraction and at least in organic/sulphide bound fraction.

Cd recovery in BCR extraction scheme was ranged between 93% and 110% for all studied samples. Cd fractionation for both MDN1 and MDN2 decreased in the order: B1>B4>B2>B3 (Fig. 3.1.2c). It can be further seen that for the majority of samples analyzed, Cd is distributed between acid soluble 53.5% and 45.8%, residual 16.8% and 31.6%, Fe-Mn oxide bound 15% and 17% and organic/sulphide 14% and 5.4% fraction for MDN1 and MDN2 respectively. Cd distribution in MDN3 was followed the order: B1>B2>B3>B4, indicating the relative importance of the acid soluble fraction followed by the Fe-Mn oxide bound, organic/sulphide and residual fractions.

The relative Cd associations, as revealed by both extraction schemes, are similar in all four equivalent fractions for all studied samples indicating the suitability and comparability of both methods for Cd. The fractionation is dominated by acid soluble fraction. It was also observed that more Cd was extracted in reducible (Fe–Mn oxide bound) fraction by Tessier's extraction scheme than by BCR scheme in B2. Again, more Cd was extracted in organic fraction (B3) by BCR scheme than by Tessier's scheme. However, for both methods Cd is extracted maximally in the most mobile phases.

3.3.2. LPF site

Arsenic

Tessier's extraction scheme exhibits As recovery ranged between 97% and 99% for all studied samples. Data obtained during the sequential extraction steps carried out on soil samples of LPF site indicate that As was distributed in the order: T5>>T4>T3>T2>T1 (Fig. 3.1.1d) for all studied samples. Results showed that in LPF1 more than 90% of As was distributed in residual fraction, while, in LPF2 and LPF3 it represents more than 80% and 50% respectively of total As content. The majority of As remained from residual fraction was distributed among other different fractions. The sum of As extracted in fractions T1, T2, T3 and fraction T4 was almost negligible for LPF1 and LPF2 samples, whereas, in LPF3, Fe-Mn oxide and organic/sulphide fractions represent 21.3% and 14.5% respectively.

As recovery by BCR extraction scheme ranged between 93% and 99% for all studied samples. More than 90% of total As was bound to residual fraction in LPF1, while both LPF2 and LPF3 represents 80% and 60% respectively of total As content. The other fractions showed a lower As content, especially for B1 and B2 which showed less than 1% of total As

content. In contrast LPF3 presents 7.4 and 12.7% for B1 and B2 respectively. As concentrated in residual fractions (Fig. 3.1.2d), which this may be considered immobile in term of mobility. The important quantities of As in residual fraction were in agreement with results of other studies investigating the distribution of this element in contaminated soils (Fernandez et al. 2004; Novoa-Munoz et al. 2007; Pueyo et al. 2008). The distribution of As into soil fractions $B4 > B3 > B2 > B1$ did not change significantly as a function of contamination level; nevertheless, the anthropogenic input mainly affected residual and reducible fractions.

It can be seen that fractionation results obtained from the two methods were similar (Table 3.1.2), the most abundant fraction being the residual fraction. Despite of the highest As contents leached from residual fraction, it can be seen that percentage of As extracted by Tessier's scheme for reducible fraction is little higher than that of BCR scheme, while As extracted in oxidisable fraction of BCR scheme was higher than that extracted in Tessier's T4 (oxidisable) fraction.

Antimony

In Tessier's extraction scheme, Sb recovery ranged between 88% and 91% for all studied samples. Sb was largely distributed in residual fraction accounting for 93.5%, 98% and 70.9% for LPF1, LPF2 and LPF3 respectively. Results showed that highest percentage of Sb was associated with residual fraction which represents metal bound to crystalline phase, followed by oxidisable fraction which represents metal bound to organic/sulphide fraction with a percentage of (0.7-15.6 %) for all samples. Sb amount relate to other fractions was very low and represents less than 3% for all samples. In all studied samples, the distribution of Sb into various fractions was as follows: $T5 > T4 > T3 > T2 \approx T1$ (Fig. 3.1.1f).

BCR extraction results showed a suitable Sb recovery ranged between 90% and 96% for all studied samples. More than 90% of total Sb was found to be bound with refractory minerals in residual fraction in LPF1 and LPF2, while LPF3, represented only 57% of total Sb content. Sb distribution followed the order: $B4 > B3 > B2 > B1$ (Fig. 3.1.2f). This finding is in agreement with that of Alvarez-Ayuso et al. (2012); Nannoni et al. (2011) which found that more than 90% of Sb was partitioned in residual fraction in former mining sites. In non-residual fraction, the highest percentage of Sb (27.2%) in LPF3 was associated with organic /sulphide fraction (B3), while in LPF1 and LPF2 it represents less than 2% and 1% respectively. Reducible fraction represents less than 10% in LPF3 and less than 2% in LPF1 and LPF2. It can be seen that a uniform fractionation pattern (residual > organic > oxidisable > reducible > exchangeable) was observed for Sb by both extraction schemes. The most

abundant fraction was residual bound; amount of Sb extracted in reducible fraction by Tessier's method was in general higher than that by BCR scheme. However, more Sb was extracted in B3 fraction than in T4 (oxidisable) fraction.

Lead

Pb recovery in Tessier's scheme was ranged between 87% and 98% for all studied samples. It was apparent from the preliminary Tessier's sequential extraction procedure that most of Pb was mainly associated with residual fraction accounting more than 90% of total Pb content in LPF1, while it represents 82% and 62% for LPF2 and LPF3 respectively. Pb distribution in both oxidisable and reducible fractions was variable for all samples accounted 6.26 to 26.5% for oxidisable fraction and 0.39 to 9.89% for reducible fraction in all samples. The low amount of Pb was associated with T1 and T2 fraction representing less than 1% for all samples. Despite the variability in total concentrations, Pb in all samples showed a similar distribution into various fractions: T5>T4>T3>T2 >T1 (Fig. 3.1.1e). The high percentage of Pb in residual fraction is in broad agreement with that observed by Paulo et al. (2011) in soil contaminated by mining activity. The input of Pb in contaminated soils was redistributed among various soil fractions, with highest enrichment in residual and reducible fractions.

BCR extraction scheme exhibits Pb recovery ranged between 91% and 98% for all studied samples. The relative distribution of Pb in different soil fractions followed the order: B4>>B3>B2>B1 (Fig. 3.1.2e). This fractionation pattern revealed that Pb was most abundant in residual fraction showing a comparable percentage with that of Tessier's scheme. The amount of Pb distributed in oxidisable fraction was ranged between 6.9 to 28.7%, while, it represents 0.22 to 7.45 % in reducible fraction for all samples. T1 and T2 also showed lowest Pb percentages <1%. Pb partitioning indicates that this element is rather stable, since it is mainly associated with residual fraction.

It can be seen that the distribution of this metal among different equivalent fractions is similar for the two methods. Also, the extracted amounts of Pb in the two schemes are slightly comparable. Pb content in oxidisable fraction extracted by BCR scheme was slightly higher than those of Tessier's scheme. Despite the analogous pattern in all fractions, fractionation by both extraction schemes substantiate that acid soluble bound fraction is the least abundant for all samples.

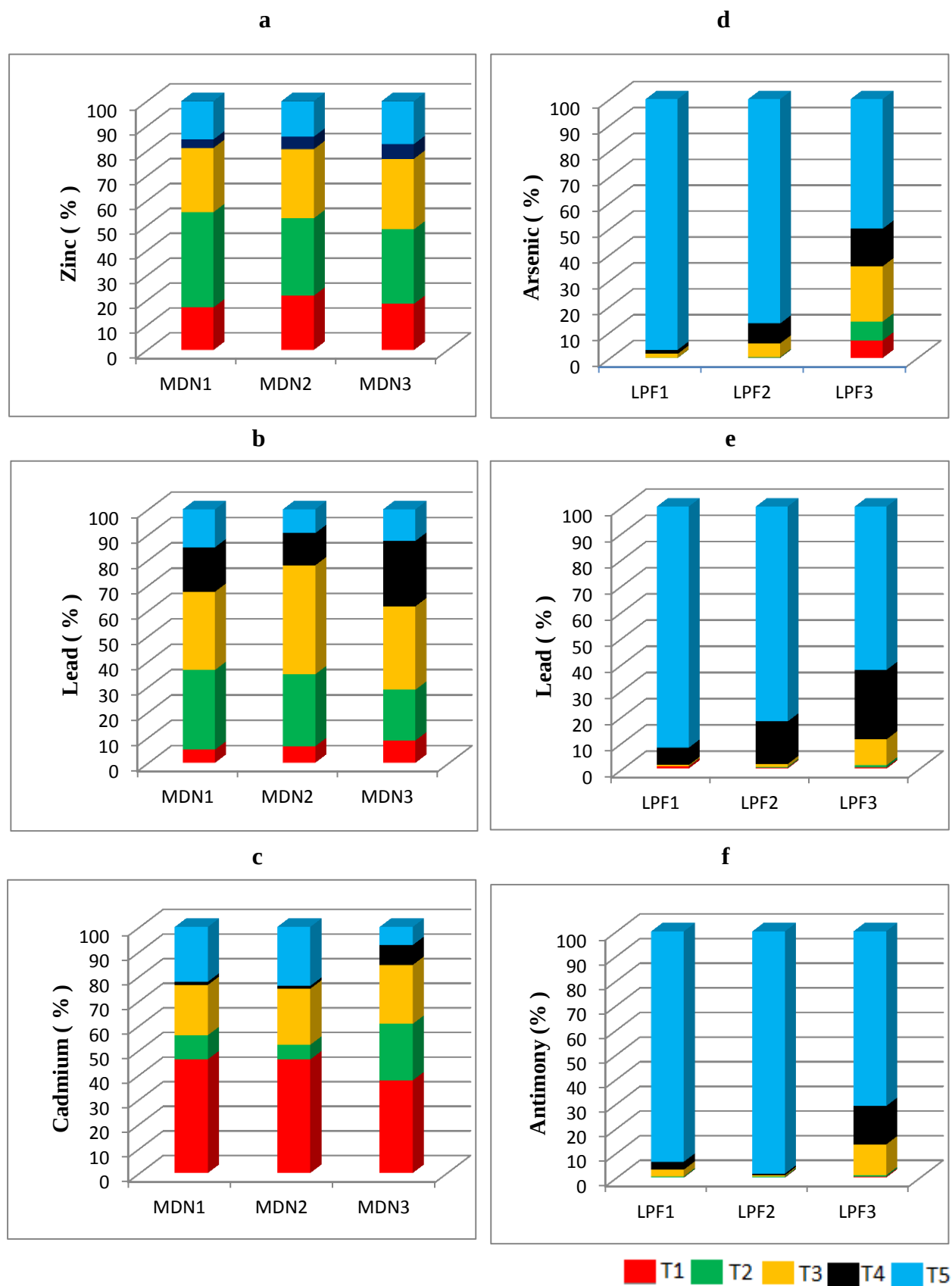


Figure 3.1.1: Chemical distribution of Zn (a), Pb (b and e), Cd (c), As (d), Sb (f) in the different soil fractions in MDN and LPF (Tessier's scheme): T1 (exchangeable), T2 (carbonates), T3 (reducible), T4 (oxidizable), T5 (residual).

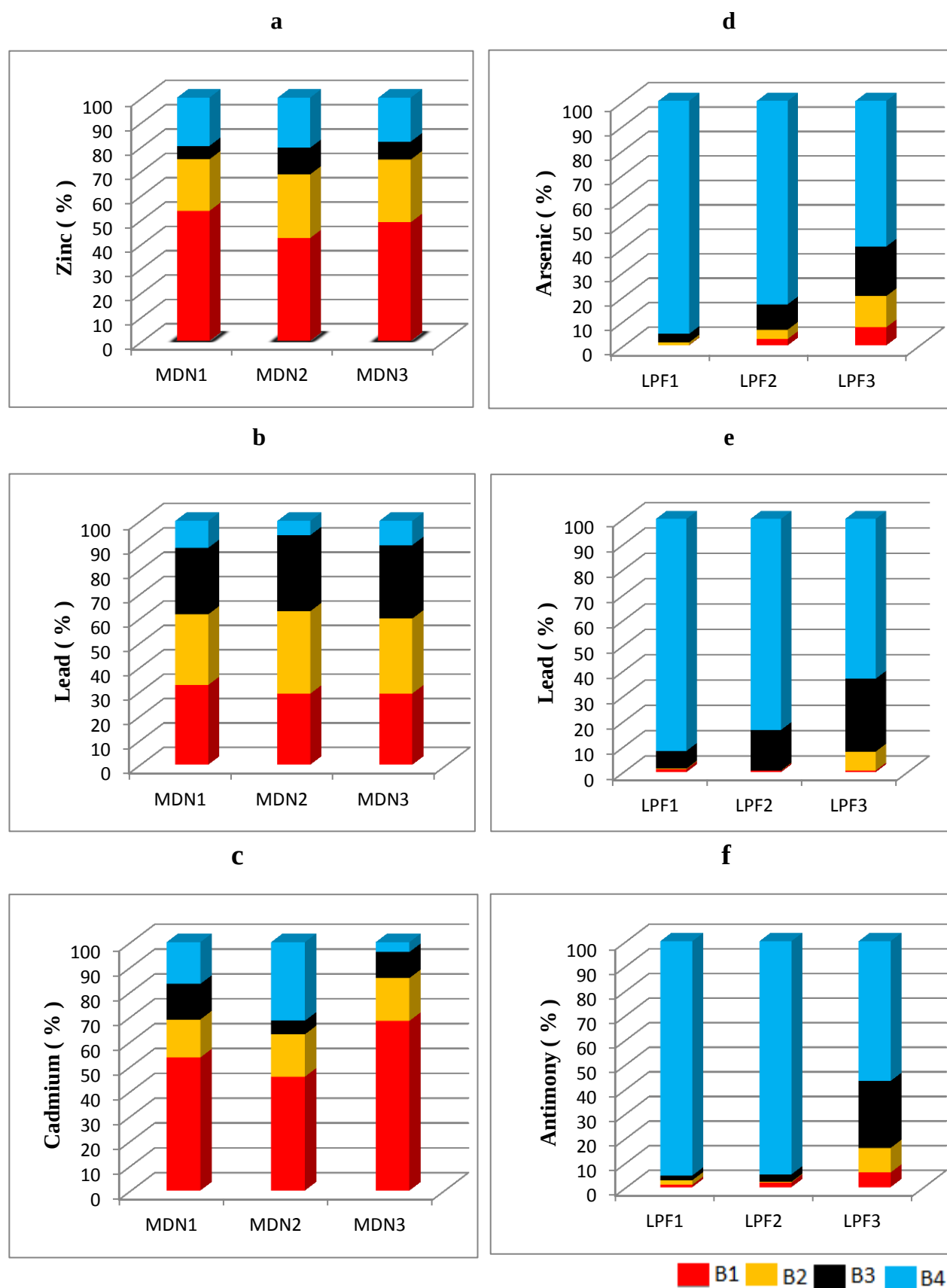


Figure 3.1.2: Chemical distribution of Zn (a), Pb (b and e), Cd (c), As (d), Sb (f) in the different soil fractions in MDN and LPF (modified BCR scheme): B1 (acid soluble), B2 (reducible), B3 (oxidizable), B4 (residual).

Table 3.1.4: Potentially toxic elements fractionation in the different solid phases as obtained from the Tessier's scheme ^a.

Sample	Exchangeable (T1)	Carbonate (T2)	Reducible (T3)	Oxidizable (T4)	Residual (T5)	% Recovery
MDN1						
Zn	17.12	38.28	25.8	3.42	15.36	95.77
Pb	5.19	31.43	30.86	17.54	14.97	96.8
Cd	46.19	9.78	20.41	1.3	22.3	84.55
MDN2						
Zn	21.77	31.11	27.78	5.01	14.31	97.73
Pb	6.52	28.37	42.97	12.7	9.41	110.25
Cd	46.13	5.95	22.79	1.13	23.96	86.83
MDN3						
Zn	18.53	29.91	28.36	5.92	17.25	98.41
Pb	8.8	20.01	32.89	25.82	12.46	92.4
Cd	37.64	23.91	22.95	8.1	7.36	105.43
LPF1						
As	0.01	0.09	1.49	1.57	96.82	99.51
Sb	0.09	0.42	2.72	3.21	93.53	91.93
Pb	0.83	0.09	0.39	6.62	92.05	98.33
LPF2						
As	0.11	0.28	5.26	7.69	86.63	99.27
Sb	0.16	0.37	0.41	0.7	98.33	90.14
Pb	0.32	0.35	1.05	16.25	82	92
LPF3						
As	6.81	7.27	21.32	14.51	50.07	97.07
Sb	0.36	0.58	12.48	15.62	70.94	88.47
Pb	0.45	0.83	9.89	26.5	62.31	87.46

^a All values are in percentages.

Table 3.1.5: Potentially toxic elements fractionation in the different solid phases as obtained from the modified BCR scheme^b.

Sample	Acid soluble (B1)	Reducible (B2)	Oxidizable (B3)	Residual (B4)	% Recovery
MDN1					
Zn	53.44	21.2	5.51	19.48	95.77
Pb	32.69	28.94	27.27	11.08	105.1
Cd	53.56	15.28	14.34	16.8	93.44
MDN2					
Zn	42.29	26.15	10.93	20.61	97.73
Pb	29.14	33.79	31.17	5.88	113.39
Cd	45.84	17.03	5.48	31.63	96
MDN3					
Zn	48.80	25.75	7.39	18.04	99.71
Pb	29.22	30.69	30.12	9.95	97.14
Cd	68.31	17.21	10.49	3.97	110.1
LPF1					
As	0.11	1.11	3.49	95.27	99.7
Sb	0.98	1.84	1.91	95.26	93.72
Pb	1.19	0.22	6.97	91.61	94.92
LPF2					
As	2.62	3.8	10.39	83.17	99.05
Sb	1.9	0.27	3.04	94.77	96.36
Pb	0.51	0.13	16.04	83.3	98.01
LPF3					
As	7.43	12.72	20.29	59.54	93.89
Sb	5.96	9.97	27.24	56.8	90.75
Pb	0.65	7.45	28.79	63.08	91.49

^b All values are in percentages.

3.4. Potential mobility of PTE in the technosols

The knowledge of the mobility and bioavailability of PTE depends not only upon the total concentration but also upon the chemical form of the PTE. In fact little information is provided by the total soil concentration. For instance of more soluble metal compounds are more mobile and toxic (Kwon et al. 2001). On the other hand, the first extraction steps in any sequential extraction procedure represent the most mobile and bioavailable fractions and may provide useful information about the PTE.

The order of mobility of PTE considering their abundance in different soil fractions followed the order: exchangeable > bound to carbonate > bound to Fe-Mn oxide > bound to organic matter > residual fraction (Tessier et al. 1979). Exchangeable elements are a measurement of those elements which are released most readily into environment under acidic conditions and may be considered the most dangerous fraction to environment (Stone and Marsalek 1996). Changes in ionic composition, influencing adsorption-desorption reactions or lowering of pH could cause remobilization of these PTE from this fraction (Ure 2001; Marin et al. 1997; Sutherland 2000). PTE bound to Fe-Mn oxides that would be released under reducing conditions represent the reducible fraction. These oxides are well known "sinks" in the surface environment for these elements (Baruah et al. 1996b) and are thermodynamically unstable under anoxic conditions (Tokalioglu 2000). PTE bound to organic matter / sulphides would be released under oxidizing conditions and thus represent the oxidisable fraction. PTE associated with oxidisable phases are assumed to remain in the soil for a longer period but may be mobilized by decomposition processes (Kennedy et al. 1997). Residual fraction represents the elements that have the strongest association with crystalline structures of the minerals and are therefore the most difficult to mobilize.

The determination of PTE mobility in soils is based on the relative amount of the metal in exchangeable fraction (T1) containing the mobile forms and in carbonate bound fraction (T2) containing easily mobilisable phases. The mobility index of PTE was calculated as the mobility factor (MF) based on the following equation by (Kabala and Singh 2001; Narwal et al. 1999; Salbu et al. 1998):

$$MF = \frac{(T_1 + T_2)}{(T_1 + T_2 + T_3 + T_4 + T_5)} \times 100$$

Consequently, the mobility factor value determines the relative mobility and biological availability of PTE in the soil. On this basis high mobility factor (MF) values have been reported or interpreted as evidence of relatively high reactivity, high lability and high biological availability of PTE in soil (Karczewska 1996; Ma and Rao 1997). On the basis of the MF values, the average mobility of PTE in the studied soil samples is shown graphically in Fig. 3.1.3 and 3.1.4 to help compare the MF values of PTE in each studied sites.

On average, the potential mobility of Cd was 52.89 % for MDN studied samples. Cd can be considered the most mobile element, as about half of its total content was in exchangeable fraction. The relationship between Cd concentrations in exchangeable fraction and carbonate content suggest that a substantial portion of Cd was contained in minerals such as calcite (in which Cd may replace Ca). As an overview of the study area, the fractionation data indicate a high mobility and bioavailability of Cd. The results are in accordance with those obtained by Kapusta et al. (2011) and Vaněk et al. (2005), indicating that Cd is the most mobile of the three metals tested (Cd, Zn, Pb).

The average potential mobility factor of Zn was 42.24%. Under reducing and acidic conditions, Zn will easily be mobilized to the environment. Therefore compared with other PTE they were mostly abundant in the residue fraction. Thus Zn was more available and potentially toxic in the environment. Part of Zn was likely related to carbonates such as Zn-rich calcite and/or smithsonite (ZnCO_3). Other acid-soluble minerals affecting the occurrence of Zn in acid soluble fraction could be sulphates (ZnSO_4) and oxide-sulphates [$\text{ZnO} \cdot \text{ZnSO}_4$; $\text{Zn}(\text{OH})_2 \cdot \text{ZnSO}_4$], whose presence was commonly detected in contaminated soils collected in mining and smelting areas (Li and Thornton 2001).

Potential mobility of Pb in MDN and LPF samples were 33.44% and 0.66 % respectively. Change in the concentration was low because Pb in soil in this environment was relatively immobile. It could be noted that any change to anoxic soil conditions (e.g. caused by water-flooding) could mobilize significant amounts of adsorbed Pb through the destabilization of the Fe–Mn oxyhydroxide lattices. Many researchers referred to that Pb in acid soluble fraction of the most contaminated soils was mainly in carbonate phases such as cerussite (PbCO_3) and hydrocerussite [$\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$] which therefore play an important role in the mobility and bioavailability of this element (Clevenger et al. 1991; Ettler et al. 2009).

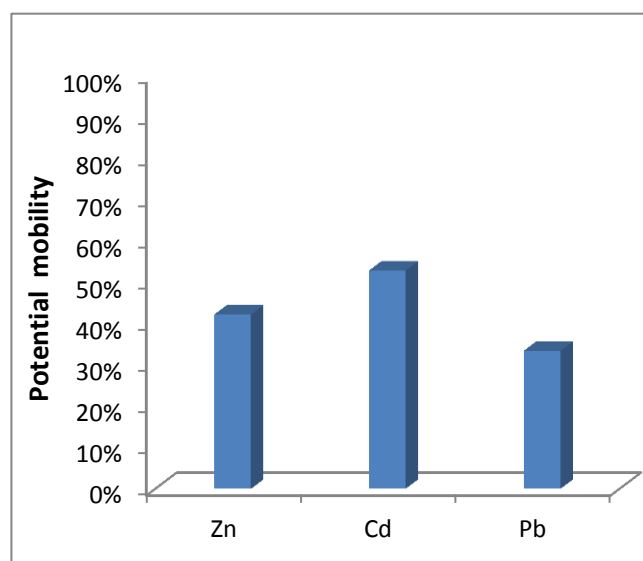


Figure 3.1.3: Potential mobility of the potentially toxic elements from MDN site

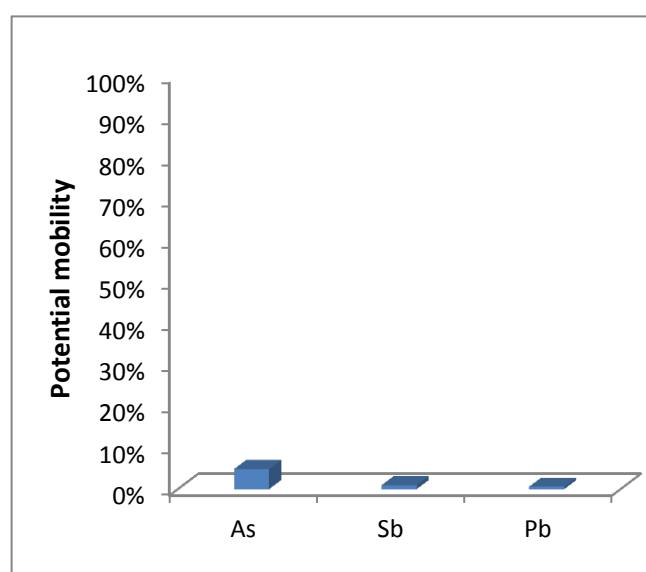


Figure 3.1.4: Potential mobility of the potentially toxic elements from LPF site

The average potential mobility factor of As was 4.86 %. In our site, As can be considered a rather immobile element as most of this metalloid is bound to the residual mineral fraction. The chemistry of arsenic precipitation–dissolution and adsorption–desorption is complex and depends on the charge of the absorbing species and the soil surface characterization. The results for arsenic fractions should reflect the geochemical behavior of arsenic in the surface environment. In our study on sequential extraction of arsenic from

contaminated technosols, we found that only a very small proportion of arsenic was extracted in the early fractions compare to the total arsenic content for both extraction schemes.

However, high concentrations of arsenic found in residual fractions indicate that arsenic present in these soils is difficulty released by chemical extractants from the first steps of the schemes. The important quantities of As in residual fraction were in agreement with the results of other studies investigating the distribution of this element in contaminated soils (Filippi et al. 2004; Ghosh et al. 2004; Matera et al. 2003).

Sb potential mobility factor in the LPF samples was 0.96 %. Similar to arsenic, Sb distribution into the soil fractions indicates that this element was rather immobile in the contaminated soils as being largely present in residual fraction. In a recent study on sequential extraction of Sb from contaminated soils, Tighe and Lockwood 2007; He 2007; Denys et al. 2008 found that a large amount (up to 90%) of Sb was associated with the residual fraction.

In general, a number of similar general trends in As and Sb fractionation in soil are evident. These include the low mobility of both As and Sb and the high proportion of both metalloids associated with the residual fraction depending on metalloid source. Metalloid associated with the crystalline and non-crystalline oxide and hydroxide minerals is often assumed to be immobile (Filella et al., 2009).

4. Conclusions

This study aimed to evaluate the soil fractionation of Zn, Pb, Cd, As and Sb in selected technosols of two PTE contaminated sites. The percentages of Zn, Pb, Cd, As and Sb extracted in Fe–Mn oxide bound fraction of Tessier's scheme were always higher than those extracted by modified BCR scheme. In contrast the percentages of Zn, Pb, Cd, As and Sb extracted in organic fraction of modified BCR scheme were always higher than those of Tessier's scheme.

Zn, Pb and Cd from MDN technosols were distributed in all fractions, with greatest enrichments in acid soluble fraction in the case of Cd. The results showed that PTE from LPF samples have the highest abundance in residual fraction. This indicates that the PTE were rather immobile. The largest proportions for As, Pb and Sb were extracted in residual phase, in which PTE are strongly retained in soil minerals. This shows that the environmental risk of these PTE may be limited. However, the relatively high PTE content in LPF samples may represents some indirect environmental risk due to clay dispersion, and disaggregated soil particles bearing PTE may eventually reach and accumulate in ground waters and food chain.

The order of mobility in technosols was: Cd>Zn>Pb in MDN samples and As>Sb>Pb in LPF samples.

The mobile and potentially bioavailable pools of these heavy elements were considerably higher in contaminated soils with respect to uncontaminated ones. In MDN samples, Cd, Zn and Pb can be considered the most mobile elements and potentially available to the biosphere, representing therefore a more significant environmental risk than Pb, Sb and As in LPF samples. The quantity of mobile and potentially bioavailable PTE in MDN soils could threaten the quality of crops, with the real risk that these elements enter the food chain. The partitioning patterns of PTE in soils of this region will therefore be a sound basis for studies focusing on soil organisms (such as earthworms), cultivated and wild vegetables and the safety of food stuffs. Comparison of both sequential extraction schemes indicates that the results are only empirically defined and are not totally exclusive to the specified mineral phase.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Baghdad, Iraq) for the financial support, Dr. Emmanuel Joussein (Université de Limoges) for help in soil sampling and XRF analysis, and Dr. Arnaud Gauthier (Université Lille 1) for help in soil sampling.

References

- Adriano, D.C., (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments; Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals, 2nd ed., Springer, New York, pp. 866.
- Afnor (1999) Recueil de Normes Françaises. Qualité des sols, Afnor Paris.
- Álvarez-Ayuso, E., Otonesa, V., Murciegob, A., García-Sánchez, A., Santa Regina, I., 2012. Antimony, arsenic and lead distribution in soils and plants of an agricultural area impacted by former mining activities. Science of The Total Environment 439, 35–43.
- Anju, M., Banerjee, D.K., (2010) Comparison of two sequential extraction procedures for heavy metal partitioning. Chemosphere 78, 1393-1402.
- Aran, D., Maul, A., Masfaraud, J.F., (2008) A spectrophotometric measurement of soil cation exchange capacity based on cobaltihexamine chloride absorbance. C R Geoscience 340, 865–871.

- Baruah, N.K., Kotoky, P., Bhattacharyya, K.G., Borah, G.C., (1996) Metal speciation in Jhanji River sediments. *Science of The Total Environment* 193, 1-12.
- Belzille, N., Lecomte, P., Tessier, A., (1989) Testing readsorption of trace elements during partial chemical extractions of bottom sediments. *Environmental Science & Technology* 23, 1015–1020.
- Benedetti, M.F., Milne, C.J., Kinniburgh, D.G., van Riemsdijk, W.H., Koopal, L.K., (1995) Metal ion binding to humic substances: application of the non-ideal competitive adsorption model. *Environ Sci Technol* 29, 446-457.
- Brookins, D.G., (1988) Use of sequential extraction to evaluate the heavy metals in mining wastes. *Water Air Soil Pollut* 50, 241–254.
- Brooks, R.R., (1983) *Biological Methods of Prospecting for Minerals*. John Wiley & Sons, New York. p. 322.
- Clevenger, T.E., Saiwan, C., Koirtyoham, S.R., (1991) Lead speciation of particles on air filters collected in the vicinity of a lead smelter. *Environ Sci Technol* 25, 1128–1133.
- Cuong, D.T., Obbard, J.P., (2006) Metal speciation in coastal marine sediments from Singapore using a modified BCR sequential extraction procedure. *Applied Geochemistry* 21, 1335–1346.
- Davies, B.E., (1983b) Heavy Metal Contamination from Base Metal Mining and Smelting: Implications for Man and His Environment. In: Thornton I (ed) *Applied Environmental Geochemistry*. Academic Press, London, p. 425-462.
- Dudka, S., Adriano, D.C., (1997) Environmental impacts of metal ore mining and processing: a review. *J Environ Qual* 26, 590-602.
- Dudka, S., Chlopecka, A., (1990) Effect of solid-phase speciation on metal mobility and phytoavailability in sludge amended soil. *Water Air Soil Pollut* 51, 153–160.
- Dutreuil, J.P., Bril, H., Roussel, C., Jarry, L., Petit, D., Minette, F., (1997) Grain size and mineralogical controls on vegetal colonisation of tailings in a former gold mine (La Petite Faye Massif central, France). In: Papunen H (ed) *Mineral Deposits*. Balkema, Rotterdam, pp. 895– 898.
- Elliott, H.A., Dempsey, B.A., Maille, M.J., (1990) Content and fractionation of heavy-metals in water treatment sludges. *J Environ Qual* 19, 330–334.
- Ettler, V., Johan, Z., Kříbek, B., Šebek, O., Mihaljevič, M., (2009) Mineralogy and environmental stability of slags from the tsumeb smelter, Namibia. *Appl Geochem* 21, 1–15.

- Fernández, E., Jiménez, R., Lallénab, A.M., Aguilera, J., (2004) Evaluation of the BCR sequential extraction procedure applied for two unpolluted Spanish soils. *Environmental Pollution* 131, 355–364.
- Filippi, M., Golia, V., Pertold, Z., (2004) Arsenic in contaminated soils and anthropogenic deposits at the Mokrsko, Roundy, and Kasperske Hory gold deposits, Bohemian Massif (CZ). *Environ Geol* 45, 716–730.
- Ghosh, A.K., Sarkar, D., Nayak, D., Bhattacharyya, P., (2004) Assessment of a sequential extraction procedure for fractionation of soil arsenic in contaminated soils. *Arch Agron Soil Scien* 50, 583–591.
- Hass, A., Fine, P., (2010) Sequential selective extraction procedures for the study of heavy metals in soils, sediments, and waste materials - a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 40, 365–399.
- Hongyu, L., Anne, P., Bohan, L., (2005) Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou lead/zinc mine spill (Hunan, China). *Science of the Total Environment* 339, 153 – 166.
- ISO (1999) Soil Quality. Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials Guidelines no ISO TC 190/SC 7 ISO/DIS 15799. ISO Geneva Switzerland.
- ISO norm 11466 (1995) Soil quality, extraction of trace elements soluble in aqua regia.
- Kaasalainen, M., Yli-Halla, M., 2003. Use of sequential extraction to assess metal partitioning in soils. *Environ Pollut* 126, 225–233.
- Kabala, C., Singh, B.R., (2001) Fractionation and mobility of copper, lead and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. *J Environ Qual* 30, 485–492.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., (2001) Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.
- Kapusta, P., Szarek-Łukaszewska, G., Stefanowicz, A.M., (2011) Direct and indirect effects of metal contamination on soil biota in a Zn-Pb post-mining and smelting area (S Poland). *Environ Pollut* 159, 1516-22.
- Kennedy, V.H., Sanchez, A.L., Oughton, D.H., Rowland, A.P., (1997) Use of single and sequential chemical extractants to assess radionuclide and heavy metals availability from soils for root up-take. *Analyst* 122, 89-100.
- Kiekens, L., (1995) Zinc. In: Alloway BJ (ed) *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic and Professional, London, pp: 284 – 305.

- Krishnamurti, G.S.R., Huang, P.M., Van Rees, K.C.J., Kozak, L.M., Rostad, H.P.W., (1995) Speciation of particulate-bound Cadmium of soils and its bioavailability. *Analyst* 120, 659 – 665.
- Li, X., Thornton, I., (2001) Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Applied Geochemistry* 16, 1693–1706.
- MacLaren, R.G., Crawford, D.V., 1973. Studies on soil copper. I. The fractionation of copper in soils. *J Soil Sci* 24, 172 – 181.
- Marin, B., Valladone, M., Polve, M., Monaco, A., (1997) Reproducibility testing of a sequential extraction scheme for the determination of trace metal speciation in a marine reference sediment by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 342, 91 – 112.
- Matera, V., Le Hecho, I., Laboudigue, A., Thomas, P., Tellier, S., Astruc, M., (2003) A methodological approach for the identification of arsenic bearing phases in polluted soils. *Environ Pollut* 126, 51– 64.
- McGarth, S.P., Loveland, P.J., (1992) *The Soil Geochemical Atlas of England and Wales*. Blackie Academic and professional London.
- Merian, E., Thomas, W., Clarkson, (1991) *Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance*. VCH The University of Michigan.
- Nabulo, G., Young, S.D., Black, C.R., (2010) Assessing risk to human health from tropical leafy vegetables grown on contaminated urban soils. *Science of the Total Environment* 408, 5338–5351.
- Nannoni, F., Protano, G., Riccobono, F., (2011) Fractionation and geochemical mobility of heavy elements in soils of a mining area in Northern Kosovo. *Geoderma* 161, 63–73.
- Narwal, R.P., Singh, B.R., Salbu, B., (1999) Association of cadmium, zinc, copper, and nickel with components in naturally heavy metal-rich soils studied by parallel and sequential extractions. *Commun Soil Sci Plant Anal* 30, 1209–1230.
- Néel, C., Bril, H., Courtin-Nomade, A., Dutreuil, J.P., (2003) Factors affecting natural development of soil on 35-year-old sulphide-rich mine tailings. *Geoderma* 111, 1 – 20.
- Nénert, S., Bril, H., Floc'h, J.P., (1997) Les districts aurifères du Haut-Limousin, Massif central français: approche minéralogique et géochimique. *Chronique Recherche Minière* 526, 3 – 15.
- Nóvoa-Muñoz, J.C., Queijeiro, J.M., Blanco-Ward, D., Alvarez-Olleros, C., García-Rodeja, E., Martínez-Cortizas, A., (2007) Arsenic fractionation in agricultural acid soils from NW Spain using a sequential extraction procedure. *Sci Total Environ* 378, 18 – 22.

- Nowak, B., (1995) Sequential extraction of metal forms in the soil near a roadway in southern Poland. *Analyst* 120, 737–739.
- Pardo, R., Barrado, E., Prez, L., Vega, M., (1990) Determination and speciation of heavy metals in sediments of Pisuerga river. *Water Res* 24, 373–379.
- Paulo, J.C., Favas, J.P., Elisa, P., Gomes, V., (2011) Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity: Environmental implications. *Journal of Geochemical Exploration* 111, 160 –171.
- Petit, M.D., Rucandio, M.I. (1999) Sequential extractions for determination of cadmium distribution in coal fly ash, soil and sediment samples. *Analytica Chimica Acta* 401, 283-291.
- Pueyo, M., Mateu, J., Rigol, A., Vidal, M., Lopez-Sanchez, JF., Rauret, G., (2008) Use of the modified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element dynamics in contaminated soils. *Environmental Pollution* 152, 330–341.
- Ramos, L., Hernandez, M., Gonzalez, M.J. (1994) Sequential fractionation of copper, lead, cadmium and zinc in soils from or near Donana National Park. *J Environ Qual* 23, 50 – 57.
- Rauret, G., (1998) Extraction procedure for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta* 46, 449–455.
- Rodriguez, L., Ruiz, E., Alonso-Azcaratec, J., Rincon, J., (2009) Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain. *Journal of Environmental Management* 90, 1106 –1116.
- Romaguera, F., Boluda, R., Fornes, F., Abad, M., (2008) Comparison of three sequential extraction procedures for trace element partitioning in three contaminated Mediterranean soils. *Environmental Geochemistry and Health* 30, 171-175.
- Sahuquillo, A., Lopez-Sanchez, J.F., Rubio, R., (1999) Use of a certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three stage sequential extraction procedures. *Anal Chim Acta* 382, 317–327.
- Salbu, B., Krekling, T., Oughton, D.H., (1998) Characterization of radioactive particles in the environment. *Analyst* 123, 843–849.
- Sanchez, G., Moyano, A., Munez, C., (1999) Forms of cadmium, lead, and zinc in polluted mining soils and uptake by plants (Soria Province, Spain). *Commun Soil Sci Plant Anal* 30, 1385–1402.

- Schuwirth, N., Voegelin, A., Kretzschmar, R., Hofmann, T., (2007) Vertical distribution and speciation of trace metals in weathering flotation residues of a zinc/lead sulfide mine. *J Environ Qual* 36, 61–69.
- Shu, W.S., Ye, Z.H., Lan, C.Y., Zhang, Z.Q., Wong, M.H., (2001) Acidification of lead/zinc mine tailings and its effect on heavy metal mobility. *Environ Int* 26, 389–394.
- Shuman, L.M., 1985. Fractionation method for soil micro elements. *Soil Sci* 140, 11 – 22.
- Stone, M., Marsalek, J., (1996) Trace metal composition and speciation in street sediment: Sault Ste. Marie, Canada. *Water Air Soil Pollution* 87, 149 – 169.
- Storer, D.A., (1984) A simple high sample volume ashing procedure for determining soil organic matter. *Commun Soil Sci Plant Anal* 15, 759 – 772.
- Sutherland, A., (2000) Comparison between non-residual Al, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn released by a three-step sequential extraction procedure and a dilute hydrochloric acid leach for soil and road deposited sediment. *Applied Geochemistry* 17, 353 – 365.
- Szulczewski, M.D., Helmke, P.A., Bleam, W.F., (1997) Comparison of XANES analyses and extractions to determine chromium speciation in contaminated soils. *Environ Sci Technol* 31, 2954–2959.
- Tessier, A., Campbell, P., Bosson, M., (1979) Sequential extraction procedure for speciation of particulate trace elements. *Analyt Chemist* 51, 844–851.
- Thiry, M., van Oort, F., (1999) Les phases minérales majeures et mineures d'une friche industrielle de métallurgie des métaux non ferreux: état d'altération, évolution géochimique et devenir des métaux polluants du site de Mortagne-du-Nord, In: Les cahiers des clubs CRIN, acte du colloque 'La Spéciation des Métaux dans le Sol. Association ECRIN Paris pp. 108–159.
- Tipping, E., Thompson, D.W., Ohnstad, M., Hetherington, N.B., (1986) Effects of pH on the release of metals from naturally-occurring oxides of Mn and Fe. *Environ Technol Lett* 7, 109 –114.
- Tokalioglu, S., Kartal, S., Elci, L., (2000) Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. *Anal Chim Acta* 413, 33-40.
- Tokalioglu, S., Kartal, S., Elci, L., (2000) Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta* 413, 33–40.
- Ure, A.M., Quevauviller, P.h., Muntau, H., Griepink, B., (1993) Speciation of heavy metal in soils and sediments. An account of the improvement and harmonisation of extraction

- techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *Int J Environ Anal Chem* 51, 135 -151.
- Ure, A.M., Davidson, C.M., (2001) *Chemical Speciation in the Environment*. Blackie, Glasgow, pp: 265-321.
- Ure, A.M., Davidson, C.M., Thomas, R.P., (1995) Single and sequential extraction schemes For Trace metal speciation in soil and sediment. *Tech and Instru in Anal Chem* 17, 505-523.
- Vaněk, A., Borůvka, L., Drábek, O., Mihaljevič, M., Komárek, M., (2005) Mobility of lead, zinc and cadmium in alluvial soils heavily polluted by smelting industry. *Plant Soil Environ* 51, 316-21.
- Weber, J.B. (1991a) Fate and behavior of herbicides in soil. *Applied plant science* 5, 28-41.
- Wilson, S.C., Lockwood, P.V., Ashley, P.M., Tighe, M., (2010) The chemistry and behavior of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. *J Environ Pollut* 158, 1169-81.
- Žemberyová, M., Barteková, J., Hagarová, I., (2006) The utilization of modified BCR three-step sequential extraction procedure for the fractionation of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in soil reference materials of different origins. *Talanta* 70, 973–978.

Chapitre 3.2

Évaluation de la phytodisponibilité des éléments potentiellement toxiques dans les technosols d'anciens sites miniers et industriels

Résumé de l'article 2

La biodisponibilité des éléments potentiellement toxiques (EPT) se définit comme étant le degré d'assimilation de l'élément par un organisme vivant et est un outil d'évaluation de la toxicité et donc du risque environnemental lié à une contamination. La biodisponibilité est dépendante de la spéciation des EPT ainsi que des facteurs physico-chimiques du sol qui la régissent.

Dans l'article précédent deux schémas d'extraction séquentielle (le schéma de Tessier et le schéma BCR modifiée) ont été utilisés pour étudier la spéciation chimique des EPT et déterminer la répartition de ces éléments dans les différentes fractions du sol. Dans cet article nous avons appliqué l'extraction simple (sélective) des EPT (Zn, Pb, Cd, As, et Sb) avec différents réactifs sur les mêmes sites étudiés précédents en combinaison avec des tests de germination (haricots nains) au laboratoire afin d'étudier leurs biodisponibilité.

Pour réaliser l'objectif de ce travail, 3 échantillons de sols de surface de chaque site nommés (MDN1, MDN2, MDN3, et LPF1, LPF2, LPF3) respectivement ont été collectés (0-20 cm de profondeur, séchés à l'air et tamisés à 2mm). Diverses méthodes d'extraction simples (CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , DTPA et EDTA) ont été utilisées avec des tests de germination utilisant des haricots nains (*Phaseolus vulgaris*) pour lesquels les concentrations foliaires et le minéral masses en EPT ont été déterminées après 21 jours de croissance.

Nos résultats ont montré que la capacité d'extraction des EPT par les extracteurs chimiques a suivi l'ordre $\text{EDTA} > \text{DTPA} > \text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{CaCl}_2 > \text{NaNO}_3$ pour les sols des deux sites. Dans les feuilles de haricots nains, le Zn présente la plus forte concentration tandis que le Sb a la plus faible concentration. L'analyse statistique a montré une corrélation positive significative entre les concentrations des EPT dans les feuilles de haricots, les concentrations extraites par CaCl_2 et les solutions de nitrate tandis que les agents complexant (EDTA et DTPA) ont montré une faible corrélation avec les concentrations des EPT dans les feuilles de haricots.

Finalement on peut considérer que la procédure d'extraction au CaCl_2 0.01 M est la plus appropriée et fournit les indications les plus utiles de phytodisponibilité pour les métaux et métalloïdes étudiés.

Article 2: Published in

(J. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22: 5961-74)

Potentially toxic elements phytoavailability assessment in technosols from former smelting and mining areas

Bashar Qasim^{1, 2, *}, Mikael Motelica-Heino¹, Emmanuel Joussein³, Marilyne Soubrand³, Arnaud Gauthier⁴

¹CNRS/ISTO Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, UMR-CNRS 7327 Campus Géosciences, 1A rue de la Férollerie, 41071 Orléans, France.

²Applied Sciences Department, University of Technology, Baghdad, Iraq.

³Université de Limoges, GRESE, EA 4330, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France.

⁴Laboratoire de Génie-Civil et géo Environnement, LGCgE-EA4515, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Abstract

This study reports the chemical bioavailability of several potentially toxic elements (Zn, Pb, Cd, As and Sb) in contaminated technosols from two former smelting and mining areas. Though these elements have long been recognized as a potentially harmful elements, understanding of their toxicity and environmental behavior in technosols developed on former mining and smelting sites are more limited, particularly for As and Sb. Surface soils were sampled from metallophyte grassland contaminated with Zn, Pb and Cd located at Mortagne – du –Nord (MDN) (North France) and from a former mining settling basin contaminated with As, Pb and Sb located at la Petite Faye (LPF) (Limoges, France). Various selective single extraction procedures (CaCl₂, NaNO₃, NH₄NO₃, DTPA and EDTA) were used together with germination tests with dwarf beans whose shoots were analyzed for their potentially toxic element concentrations after 21 days of growth. The extraction capacity of the potentially toxic elements followed the order: EDTA>DTPA>NH₄NO₃>CaCl₂> NaNO₃ for both studied areas. Pearson's correlation coefficient analysis between the concentrations of potentially

toxic elements accumulated in bean primary leaves or their mineral mass with their extractable concentrations showed a positive significant correlation with dilute CaCl_2 and nitrate solutions extraction procedures. In contrast, for all studied elements, except Pb, the complexing and chelating extractants (EDTA and DTPA) exhibited poor correlation with the dwarf bean leaves concentrations. Moreover results showed that the 0.01M CaCl_2 extraction procedure was the most suitable and provided the most useful indications of metal phytoavailability for studied elements.

Keywords: Potentially toxic element, Partial extraction, Bioavailability, Mining and smelting activities, Technosol.

1. Introduction

High metal and metalloid concentrations in soils have negative effects on terrestrial ecosystems and generate potential health risks (Brown and Calas, 2011). Mining and smelting activities are the major sources of metals contamination by release of a huge amount of potentially toxic elements (PTE) into the environment through wind and water runoff erosion (Razo et al. 2004; Navarro et al. 2008). The accurate estimation of PTE bioavailability in soils is becoming more important to improve the management of contaminated land. Thus, information about accumulation of different PTE in different vegetable species, as well as soil factors that control their bioavailability is very important issues (Xu et al. 2013).

Due to different and complex distribution patterns of PTE among various chemical species and solid phases, their total concentration in soils is not a good indicator of their availability (Abollino et al. 2002). It appears therefore that the knowledge of PTE availability and ecotoxicity is more suitable than their total concentration for predicting their transfer from the soil to plants and may provide useful information to improve environment risk assessment (McLaughlin et al. 2000; Menzies et al. 2007; Plaza et al. 2010).

There is no ideal definition of the bioavailable fraction of PTE in soil. The International Standards Organization's (ISO) defined bioavailability as the degree to which chemicals present in the soil may be absorbed or metabolized by human or ecological receptors or are available for interaction with biological systems (ISO 11074 (2005)). The bioavailability of PTE in soils depends on the PTE species and their partitioning between the solid phase and the soil pore water. In the past few decades, many studies have been realized to evaluate PTE

phytoavailability and related their uptake by plants with their extractable fractions by different chemical agents (Houba et al. 1990; Gupta and Aten, 1993; Pascual et al. 2004).

A wide range of single and sequential extraction schemes have been designed in order to assess the different binding forms of PTE in soils. The mobility and toxicity of PTE in soils were assessed depending on their total concentration in the soil, as well as their specific chemical form, physico-chemical properties, their binding state and soil properties like pH and organic matter content (Nyamangara 1998). Water-soluble, exchangeable, carbonate associated, Fe/Mn oxide-associated, organic-associated and residual forms are often the geochemical forms in which PTE are believed to accumulate in soils. Water-soluble and exchangeable fractions are considered to be bioavailable while the mineral fraction is mainly not available to either plants or microorganisms (Rodriguez et al. 2009; He et al. 2005). However, the lack of selectivity of the extraction reagents and artifacts such as coprecipitation, reprecipitation and readsorption of previously released PTE are the main limitations of such procedures (Cornu and Clozel 2000; David et al. 2002).

PTE extracted by single extractants are usually considered as indicators of the availability in soils (Black et al. 2011; Chojnacka et al. 2005; McBride et al. 2003). In fact, techniques to estimate the bioavailability of PTE have focused on selecting suitable extractants and developing extraction procedures with different experimental conditions (Black et al. 2011; Anjos et al. 2012). The advantages of a single extractant test compared with a bioassay to determine bioavailability include the simplicity and reproducibility, reduced costs and reduced time frame (Conder et al. 2001). Several authors (Li et al. 1996; Lin et al. 1998) consider that a more correct approach to the distribution of species in natural environment could be obtained by studying the kinetics of the extraction with a single reagent. Moreover combination of data from extraction procedures and the PTE quantities that accumulated in plants growing on contaminated sites can provides good information for identifying their input into the environment (Wang et al. 2009; Meers et al. 2005; Fernandez et al. 2002).

The most widely used extractants in single extraction methods include: i) chelating, complexing or reducing agents (such as EDTA and DTPA extractants) which are considered as suitable for the prediction of plant uptake by extracting a large portion or the entire total PTE from the solid phase, ii) acid extractants (such as 0.1M HCl because low pH favors the dissociation of the existing complexes) and iii) neutral salt extractants based on un-buffered salt solutions, which mainly dissolve the cation exchangeable fraction (such as 0.01M CaCl₂, 0.1M NaNO₃ and 1M NH₄NO₃) which are often called 'mild' extractants. ((Ure et al. 1993;

Brun et al. 1998; Negrel et al. 2000; Sutherland 2002; McCready et al. 2003; Feng et al. 2005; Gupta and Sinha 2007; Fang et al. 2007; Menzies et al. 2007; Kubova et al. 2008; Black et al. 2011).

The aim of this study was thus to assess the chemical availability and phytoavailability of PTE, respectively Zn, Pb and Cd, in contaminated surface technosols from metallophyte grassland located at (Mortagne-du-Nord, France) and As, Pb and Sb from a former mining site (La Petite Faye, Limoges, France) using various chemical single extraction procedures and germination tests with dwarf beans. Results of the chemical extraction tests were compared with the PTE concentrations of primary dwarf bean leaves and mineral masses in order to gain information about the plant availability and mobility.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling

Two contaminated technosols were selected for this study. The first one is metallophyte grassland contaminated with Zn, Pb and Cd located at Mortagne-du-Nord (MDN) in Northern France. This area is adjacent to the former metallurgical site occupied for over 60 years by a Zn smelter unit linked to a sulfuric acid production unit and a Pb smelting unit (Thiry and van Oort 1999). The second is a former mine tailing of La Petite Faye (LPF) located 60 km North-East of Limoges (France), where about 35000 t wastes from a former gold mine are stored for over 45 years. These mining wastes were characterized by high total concentrations in PTEs such as As, Pb and Sb. (Néel et al. 2003).

Three locations from each site named (MDN1, MDN2, MDN3) and (LPF1, LPF2, LPF3) respectively were selected for this study according to the level of PTE concentrations and spatial distribution of the vegetation cover. In the MDN site the vegetation cover essentially consists of *Arabidopseshallari* and *Avena sativa* L., whereas, in LPF site, *Graminea*, *Equisetum telmateia*, *Betulapendula* and *Pteridiumaquilinum* were present with large horsetails of black alder and poplar (Wanat et al. 2014).

Surface soils (0-20 cm) were sampled from each location with a stainless steel spade. All soil samples collected were carefully transferred to clean polyethylene bags before transport to the laboratory. Collected soil samples were oven-dried at a constant temperature of 40°C, manually homogenized and then quartered. Two equivalent fractions were obtained from each quartered sample. One fraction was used for the determination of the soil physico-chemical properties whereas the other fraction was used for chemical analysis of PTE.

Samples for chemical analysis were sieved first using a 2mm mesh sieve, to remove gross plant matter and subsequently crushed to pass through a 250µm sieve (Brooks 1983).

2.2. Reagents and standards

All the reagents used to prepare the extracting solutions were products of analytical-grade quality (Merck pro-analysis, Darmstadt, Germany). All solutions and dilutions were prepared using doubly deionized water ($18.2\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$) (Thermo Scientific Barnstead Easy pure II systems). Standard stock solutions of $1000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of different elements were prepared from metal wires or salts of purity higher than 99.998% (VWR international, BDH Prolabo ICP Standards, Belgium). Diluted standard working solutions were prepared from these on a daily basis. All laboratory glassware and plastic ware were rinsed three times with double deionized water after being soaked in a HNO_3 (10%, v/v) batch for 24h.

2.3. Aqua regia / hydrofluoric acid digestion

The pseudo-total element concentrations were determined by aqua regia / hydrofluoric acid digestion (Zhang et al. 2008). Approximately 1 g of the sample was accurately weighed into a 100ml Teflon beaker. 20 ml of aqua regia ($\text{HNO}_3\text{:HCl}$, 1:3v/v) and 20 ml of concentrated hydrofluoric acid were added to the beaker. The beaker was then placed on a hot plate that had been adjusted to 130–150°C. After the solution was evaporated to near dryness, the beaker walls were rinsed with double deionized water and this solution was heated to dryness. One milliliter of concentrated nitric acid and a further 20 ml of double deionized water were added after the beaker was removed from the hot plate and cooled to room temperature. The beaker was heated again on a hot plate at 90–100°C, most of the sample being digested into solution after 1h. Cooled to room temperature; the solution was filtered through a 0.45µm cellulose nitrate filter and then diluted to volume with double deionized water in a 100 ml volumetric flask.

The PTE concentrations in the solutions were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP–MS, Finnigan Element XR, Thermo Electron, Germany). Blank extractions (without sample) were carried out throughout the complete procedure.

2.4. Single extraction methods

Two categories of extractants were used in this study: (i) CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 as salts or cationic exchange extractants and (ii) EDTA and DTPA as chelating or reducing

agents. For CaCl_2 extraction, 10 ml of 0.01M CaCl_2 were added to 1.0g of soil in a 25 ml polypropylene centrifugation tube for each soil sample, shaken for 2h at 20°C (Uzu et al. 2009). The liquid to solid ratio of 10 is high enough to avoid sample heterogeneities (Houba et al. 1996). For NaNO_3 , 20ml of 0.1M NaNO_3 were added to 8.0g of air-dry soil, shaken for 2 h at 20°C (Gupta and Aten 1993). For NH_4NO_3 extraction, in 100ml polypropylene centrifugation tube, 50 ml of 1M NH_4NO_3 were added to 10 g of air-dry soil, shaken for 2 h at 20°C (Gupta and Sinha 2007). In the case of EDTA extraction, 25ml of 0.05 M EDTA were added to 5.0 g of air-dry soil, shaken for 1 h at 20°C (Quevauviller et al. 1997). For DTPA extraction, 20ml of extractant consists of 0.005M DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid), 0.1M triethanolamine, and 0.01M CaCl_2 , with a pH of 7.3 were added to 10g of air-dry soil, shaken for 2h at 20°C (Lindsay and Norvell 1978).

For all above procedures, after agitation, samples were subsequently centrifuged and the samples were filtered through a 0.45 μm filter paper then acidified with a few drops of concentrated HNO_3 to prevent adsorption to the polyethylene of the storage vessel. The acidified supernatant was collected in polyethylene bottles and stored at 4°C until analysis. PTE concentrations were determined by ICP-MS (Finnigan Element XR, Thermo Electron, Germany). Three replicates were performed for each sample and for each procedure. Blanks from extracting reagents described above were measured in parallel for each batch of analysis. ICP-MS measurements were carried out by diluting 1:10 CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , EDTA and DTPA extracts (in 1% HNO_3) to minimize interferences from calcium and sodium present in the extracts (Vaughan et al. 1986).

2.5. Germination tests

Pot experiments were conducted with contaminated technosols from the MDN and LPF sites. Approximately 1kg of soil for each sub-location was potted in plastic plant pots after homogenizing and sieving the soil to pass a 2mm mesh. 4 seeds of dwarf bean were sown in each pots and cultivated for 21 days in controlled conditions (16h light/8h darkness regime, 25°C/21°C). The photoperiod was set at 16h day with an approximate photon flux of 150 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The soil water holding capacity was kept between 55% and 65% of the potential water holding capacity by daily measuring weight of each pot. It was adjusted with deionized water throughout the experimental period.

2.6. Plant analysis

Plants were harvested 21 days after sowing, the above ground plant tissues (primary leaves) were cut and rinsed thoroughly with double deionized water. Washed leaves were dried at 80°C for 72h before recording the dry matter yield. Dried plant leaves were ground with a laboratory grinder and digested with a pressurized closed-vessel microwave system (Multiwave 3000, Anton Paar GmbH, Germany). Microwave polyfluoroacetylene (PFA)-teflon vessels were cleaned before each digestion using 10ml of aqua regia (HNO₃/HCl, 1:3v/v), heated for 20min. at 200°C and then rinsed with double deionized water. After the microwave-assisted digestion procedure was optimized, the following conditions were employed: samples were accurately weighed to 200mg (± 0.1 mg) in microwave vessels.

The digestion program consisted of a 15min gradual increase to 200°C, a 15min digestion step at 200°C and 1200w and then a cooling stage. After cooling to room temperature, the samples were filtered through a 0.45 μ m filter paper and diluted to 50 ml with ultra-pure water (18 M Ω cm⁻¹). Blanks were processed in a method identical to the samples. ICP–MS measurements were carried out by diluting 1:10 the plant digests to determine the primary dwarf bean leaves PTE concentrations. Mineral masses of PTE related to one dwarf bean were calculated based on the bean dry weight and PTE concentration in the bean leaves.

2.7. Statistical analysis

All tests were performed in five replicates and results are presented as mean $\pm$ standard deviation. The data were statistically analyzed using Excel and Statistica 10 package software. Statistical analysis including Pearson's correlation coefficient were calculated to determine the relationships between the PTE concentrations in the above parts of dwarf bean (primary leaves), the PTE mineral masses and extractable PTE concentrations in soils by the various single extraction methods. The correlations were examined based on plant concentrations on dry weight (DW) basis. The level of significance was set at ($P < 0.05$).

Table 3.2.1: Physico-chemical characteristics of the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) and La Petite Faye (LPF) (n=3; $\pm$ standard deviation).

Parameters	MDN samples			LPF samples		
	MDN1	MDN2	MDN3	LPF1	LPF2	LPF3
pH-H ₂ O	6.92 $\pm$ 0.12	6.35 $\pm$ 0.34	6.14 $\pm$ 0.17	3.65 $\pm$ 0.05	4.93 $\pm$ 0.42	5.75 $\pm$ 0.11
EC (μ S.cm ⁻¹)	112.2 $\pm$ 3.8	112.6 $\pm$ 7.4	113.71 $\pm$ 1.9	258.41 $\pm$ 4.1	200.51 $\pm$ 3.6	150.81 $\pm$ 3.84
CEC c mol(+) kg ⁻¹	7.21 $\pm$ 0.70	8.53 $\pm$ 0.25	6.74 $\pm$ 1.21	18.38 $\pm$ 0.70	29.14 $\pm$ 0.20	39.73 $\pm$ 0.31
TOC %	3.35 $\pm$ 0.94	4.39 $\pm$ 0.14	6.45 $\pm$ 0.10	0.34 $\pm$ 0.82	0.47 $\pm$ 0.47	1.67 $\pm$ 0.83
Clay %	0.95 $\pm$ 0.24	0.86 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.24	3.79 $\pm$ 0.34	1.07 $\pm$ 1.03	2.02 $\pm$ 0.41
Silt %	22.3 $\pm$ 0.35	22.16 $\pm$ 0.4	22.13 $\pm$ 0.34	48.09 $\pm$ 0.54	19.81 $\pm$ 0.24	39.14 $\pm$ 0.23
Sand %	75.4 $\pm$ 0.12	76.84 $\pm$ 1.0	76.66 $\pm$ 0.28	48.12 $\pm$ 0.15	78.65 $\pm$ 0.64	58.80 $\pm$ 0.03

EC: electrical conductivity, OM: organic matter, TOC: total organic carbon, CEC: cation exchange capacity.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical properties of the studied soils

The main physico- chemical properties of the soil samples are summarized in Table 3.2.1. pH of MDN samples was slightly acid and ranged from 6.14 to 6.92, whilst, pH of LPF samples was acidic to slightly acid ranged from 3.65 to 5.75. Organic carbon ranged from 3.35 to 6.45% and 0.3 to 1.67% for both MDN and LPF samples respectively. Cation exchange capacity varied from 6.7 to 8.5 c mol(+)kg⁻¹ and 18.3 to 39.7 cmol(+)kg⁻¹ for MDN and LPF respectively. Pseudo total PTE contents for both MDN and LPF soil samples are presented in Table 3.2.2.

Table 3.2.2: Pseudo total potentially toxic element content (mg.kg^{-1}) for the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) and La Petite Faye (LPF) ($n=3$; $\pm$ standard deviation).

Sample	Zn	Pb	Cd
	mg kg^{-1}		
MDN1	7721 $\pm$ 12	3558 $\pm$ 10	72 $\pm$ 11
MDN2	3111 $\pm$ 11	876 $\pm$ 8	63 $\pm$ 5
MDN3	3124 $\pm$ 9	879 $\pm$ 5	53 $\pm$ 6
	As	Pb	Sb
	mg kg^{-1}		
LPF1	83937 $\pm$ 11	16100 $\pm$ 13	871 $\pm$ 8
LPF2	37458 $\pm$ 8	8536 $\pm$ 7	498 $\pm$ 7
LPF3	2677 $\pm$ 4	362 $\pm$ 4	100 $\pm$ 9

3.2. PTE extractability

The results of Zn, Cd, Pb, As and Sb extractabilities in mg kg^{-1} obtained with the five extraction procedures on the studied polluted samples are presented in Table 3.2.3 and Table 3.2.4 for the MDN and LPF samples respectively. To help compare the metals extracted by different methods, the relative metals extractabilities expressed in percent are presented in Fig. 3.2.1. The CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , EDTA and DTPA soil extractable fractions were different from sample to sample for both studied sites.

The highest extracted amounts of Zn were observed for the highly contaminated soil (MDN1). Zn extractability obtained with the EDTA extraction was higher compared with that obtained with the DTPA and the other extraction procedures for all MDN selected locations. The extracted Zn decreased successively for extraction with DTPA to NaNO_3 , but exhibited a significantly higher extracted amount for the EDTA solution. NaNO_3 exhibits the lowest extraction efficiency in all samples.

Overall, the sequence of Zn extractability in all studied samples being: $\text{EDTA} > \text{DTPA} > \text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{CaCl}_2 > \text{NaNO}_3$, except, for MDN2, extractable-Zn was found higher with CaCl_2 than that of NH_4NO_3 . It can be seen that dilute CaCl_2 and nitrate extracting media does not extract high amount of PTE as compared to the complexing extracting media

such as EDTA. These results are in concordance with previous studies, where EDTA was found the best extractant for phytoavailability of metals and solubilizes solid phase minerals giving a potential to over-estimate the bioavailable fraction of metals in soils (Singh, 2007). McLaughlin et al. (2000) also suggested that complexing extractants may provide a better estimate of potential hazards from future mobilization of metals than neutral salt extractions.

Table 3.2.3: Extractable potentially toxic element content in the selected (MDN) samples (mg kg⁻¹) (n=3; ± standard deviation).

Element	MDN 1	MDN 2	MDN 3
Zn			
CaCl ₂	993.47±7.25	642.85±9.87	674.51±3.35
NaNO ₃	906.64±2.11	315.67±4.94	409.27±1.96
NH ₄ NO ₃	1082.44±4.74	674.61±0.37	591.63±1.10
EDTA	2366.38±3.23	2113.24±7.36	2564.84±0.94
DTPA	1375.37±1.31	611.67±2.51	772.81±0.26
Pb			
CaCl ₂	166.10±4.74	74.78±3.29	93.24±1.19
NaNO ₃	137.57±1.28	64.14±0.41	80.64±4.22
NH ₄ NO ₃	182.58±0.61	96.28±4.43	120.65±0.15
EDTA	3318.45±2.23	780.43±1.71	731.84±7.37
DTPA	446.20±7.10	191.27±3.53	206.35±5.28
Cd			
CaCl ₂	35.84±0.90	25.24±1.49	27.45±1.56
NaNO ₃	30.08±2.31	21.22±0.60	23.21±2.50
NH ₄ NO ₃	32.88±1.72	24.21±10	25.44±2.51
EDTA	49.21±2.53	50.74±3.67	40.53±0.8.42
DTPA	37.43±2.41	34.67±0.32	36.21±2.20

Table 3.2.4: Extractable potentially toxic element content in the selected (**LPF**) samples (mg kg⁻¹) (n=3; ± standard deviation).

Element	LPF1	LPF2	LPF3
As			
CaCl ₂	43.07±4.64	62.62±0.96	153.22±1.36
NaNO ₃	20.59±1.29	43.04±1.14	132.52±0.63
NH ₄ NO ₃	36.72±0.67	51.48±0.20	148.02±1.31
EDTA	6931.24±2.41	1151.57±1.34	486.84±2.11
DTPA	5.17.23±0.72	14.14±0.81	15.37±3.30
Pb			
CaCl ₂	117.82±2.71	17.48±2.44	9.52±1.78
NaNO ₃	101.34±0.82	11.37±1.10	9.40±2.11
NH ₄ NO ₃	137.32±4.85	19.77±0.01	17.31±0.45
EDTA	1167.52±0.28	137.24±3.72	93.44±0.03
DTPA	314.57±5.21	25.42±6.73	21.51±1.45
Sb			
CaCl ₂	4.62±2.71	3.75±1.31	6.96±0.46
NaNO ₃	2.53±0.66	1.04±2.92	3.30±0.71
NH ₄ NO ₃	3.85±2.49	3.44±42	6.24±2.45
EDTA	103.67±4.28	55.25±3.37	11.42±1.10
DTPA	57.43±1.11	22.78±2.73	8.42±0.66

Similarly to Zn, the highest amount of extracted Cd was also observed for MDN1 with the EDTA extract. The amount of Cd extracted with EDTA and DTPA procedures was always higher than with the other solutions, the sequence of extractability in all samples being: EDTA>DTPA>CaCl₂>NH₄NO₃>NaNO₃. Gupta and Sinha (2007) also reported that the complexing agents such as EDTA and DTPA were extracted higher Cd content in tannery waste contaminated soil. Indeed, in a comparison of the effectiveness of the neutral salt solutions, NH₄NO₃ extractability was in general higher than that obtained with CaCl₂ and NaNO₃. For MDN2, the extraction efficiency (CaCl₂>NH₄NO₃) for both Cd and Zn is consistent with previous findings of Novozamskyet al. (1993); Száková et al. (2001) and Pueyo et al. (2004) which that due to the combined effect of complexation by chloride, CaCl₂ in some soils can extract a higher metal amount than that by NH₄NO₃.

For Pb, similar extraction efficiencies for all studied samples were obtained. Again, the extractability with EDTA was higher in comparison with the other extractants. In contrast to the EDTA, other methods yielded 10 times lower extracted amounts. The extraction efficiency in all samples decreased with the order: EDTA>DTPA>NH₄NO₃> CaCl₂>NaNO₃. This result is consistent with the findings of Menzies et al. (2007); Gupta and Sinha (2007). Due to fact that many precipitation processes (e.g. hydroxides, carbonate and phosphates) affect the Pb extract content in soils, Lebourg et al. (1998b) referred to that these processes are limiting the estimation of lead bioavailability in soils by using the mild extraction solutions. In recent study, Gupta and Aten, (1993); Hornburg et al. (1995) have also referred to that the using of these extraction procedures have exhibits low Pb extractability.

Among all the extractants, EDTA extraction showed the better extractability of As and Sb in all the tested contaminated soil samples. Overall, extraction capacity was as follows: EDTA>DTPA>NH₄NO₃>CaCl₂>NaNO₃. These results are consistent with that reported by Etteler et al. (2007a). It can be seen from the results, the concentration of the EDTA-extractable Sb was in the range of 11.1 – 11.8%. These results are relatively similar to that reported by He (2007) and Serafimovska et al. (2012) for the phytoavailable fraction (2.1 – 11.8%) of Sb in contaminated soils. The relatively high phytoavailable As and Sb can represent a significant proportion in highly contaminated soils, but actual uptake will depend on plant species (Pérez-Sirvent et al. 2011).

In this study, it can be observed that neither dilute CaCl₂ extracting media nor nitrate solutions extract very high amount of elements as compared to EDTA and to total metal contents especially for LPF metals As, Pb and Sb. On the other hand, Zn, Pb and Cd in MDN site showed a better extractability in comparison to both total content and to LPF site metals. This is due to the fact that LPF site PTE were strongly associated with the residual fraction in all studied samples, whereas, a good percentage of PTE in the MDN site were found to associated with acid soluble fraction (Qasim and Motelica-Heino, 2014). This findings matched with that of (Lintschinger et al. 1998; Tighe et al. 2005; Denys et al. 2008; Wanat et al. 2013; 2014) which the low soluble contents can be explained by the association of As and Sb to stable phases, as iron oxides and residual fraction.

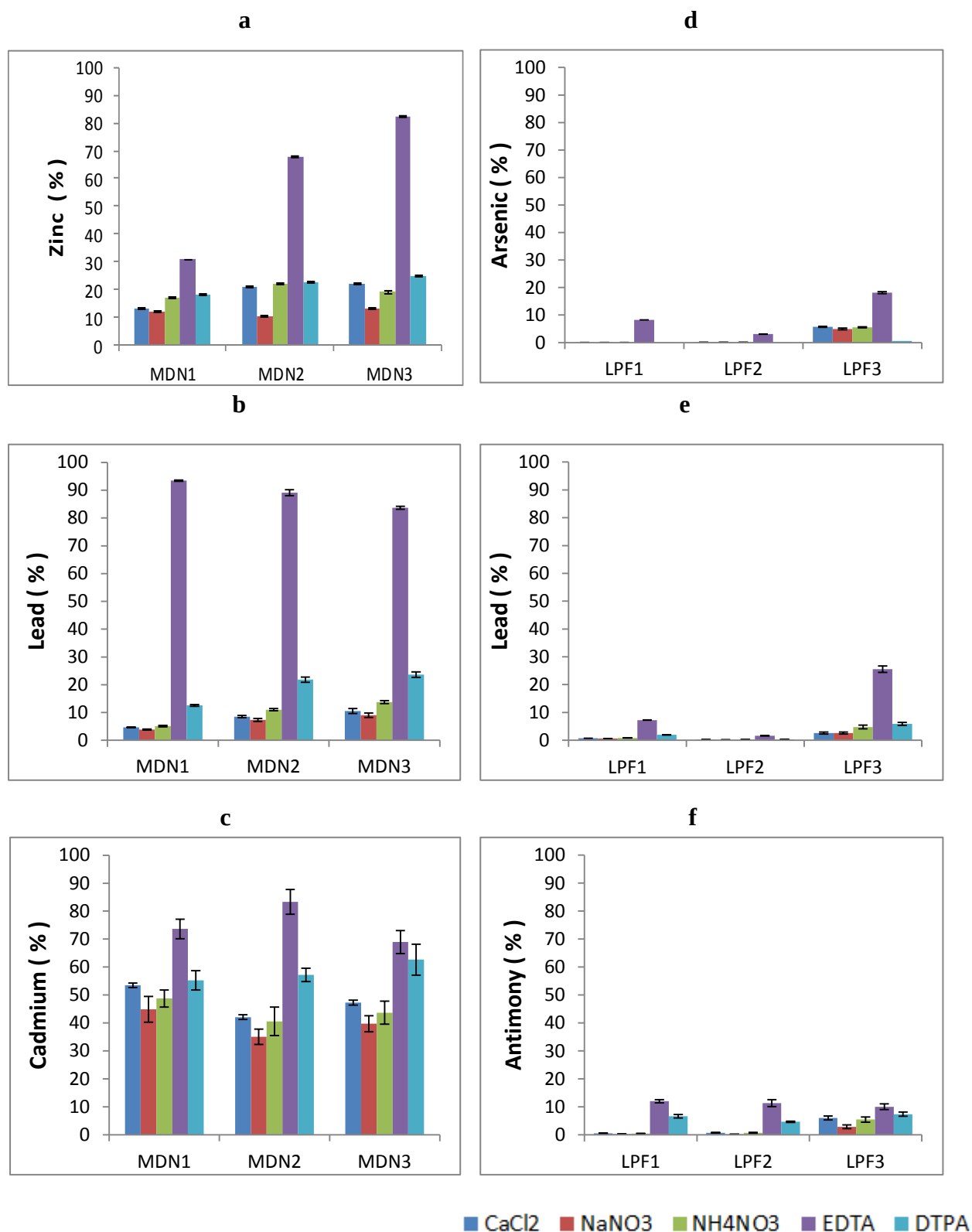


Figure 3.2.1: Extractable potentially toxic elements (Zn, Cd, Pb, As and Sb) (%) by various single extractants (CaCl₂, NaNO₃, NH₄NO₃, EDTA and DTPA) for MDN site (a, b and c) and LPF site (d, e and f).

3.3. Evaluation of single extraction efficiency

From the results obtained during our work (Table 3.2.3 and 3.2.4) it can be seen that the EDTA was found to be the most efficient solution due to extract both carbonate and organically bound fractions of PTE which may be due to its low pH (Sahuquillo et al. 2003). EDTA extractants use organic ligands capable of forming strong complexes with metals as the basis of the extraction process (Menzies et al. 2007). Moreover, Dermont et al. (2008b) in reviewing soil washing for metal removal, considers that EDTA is effective because it is recoverable and reusable (low biodegradability).

DTPA was also found to be an efficient extraction solution for soils with pH >5 to neutral pH conditions, but it exhibits low efficient in highly acidic soil for some PTE (in the case of As), where DTPA extracted amounts significantly lower than that of other extractants. This is probably due to the re-adsorption of negatively charged metal-DTPA complexes. Furthermore, Norvell (1984) and Ettler et al. (2007b) also reported that the pH buffering capacity of the DTPA method fails in some highly acidic soils.

In general, complexing agents form soluble complexes with metals in solution, thus reducing their activity and causing additional metal ions to desorb from the soil (Singh, 2007). Moreover, complexing agents are aggressive and solubilize solid phase minerals giving a potential to over-estimate the bioavailable fraction of metals in soils.

Besides, the NH_4NO_3 extraction solution yielded higher values for the extracted concentrations for all the studied PTE than that of CaCl_2 , except for As and Sb in some soils. Lebourg et al. (1998a); Pueyo et al. (2004) referred to that the high Cd and Zn extractability obtained with the NH_4NO_3 procedure in comparison with the other neutral salt solutions might be due to the higher salt concentration of the NH_4NO_3 solution and the possible complexation of these elements by NH_3 .

The use of neutral salt solution such as CaCl_2 solution as extractant is advocated on the assumption that phytoavailable PTE are mostly located on mineral surfaces and can be displaced by other cations (Meers et al. 2007a). Hornburg et al. (1995); Lopez-Sanchez et al. (2002) referred to that as due to the combined effect of complexation by chloride; CaCl_2 can extract higher amounts of both Zn and Cd than the other neutral extractants. Also, van der Sloot et al. (1996) reported that the divalent cation Ca^{2+} can remove them more easily than monovalent cations, such as Na^+ and NH_4^+ by the fact that these elements are adsorbed in cation-exchange positions.

Weak salts are favored because of their role in releasing elements from particular soil phases with which they are bound or associated especially CaCl_2 . The use of CaCl_2 solution in this experiment might be due to that several studies have shown its ability to predict soil-solution concentrations for metals (e.g. Cd, Zn), and also, the extracted metals are not re-adsorbed on the solid soil constituents during the extraction, which are present in the extracts as free ionic forms or positively charged chloro-complexes (Pueyo et al. 2004; Meers et al. 2007b; Ettler et al. 2007b).

3.4. PTE bioavailability

The pot experiment of dwarf beans grown in both MDN and LPF soils for 21 days showed an accumulation of varying amounts of PTE in the plant primary leaves. Among all tested elements, the accumulation of Zn was found maximum, whereas, Sb was found to be minimum in the plant leaves. On average, the total areal biomass after 21 days varied between 0.06 and 0.16 g/plant dry weight. In the present study, the range and distribution of observed primary leaves concentrations for all PTE were broad (Table 3.2.5).

In general, dwarf bean plants growing in the MDN soils were found to have high Zn concentration (240 – 372 mg kg^{-1} DW). Foliar Zn concentration in MDN1 plants was 1.5 times higher compared to both MDN2 and MDN3.

The bean leaves presented Zn levels generally above the considered normal levels of Zn in plant tissues (10 to 100 mg kg^{-1}) according to Frisberg et al. (1986), which may indicate that these plant species growing on the contaminated site were tolerant to Zn. The high level of Zn concentrations in bean leaves may be due to the fact that Zn have a high mobility, and particularly in the Zn-rich soils, Zn might be translocate from the plant roots (which contain high Zn levels) and accumulated in the top parts of the plant.

Foliar Cd concentrations varied from 3.12 – 6.30 mg kg^{-1} DW, this value being much higher than that reported by Feeney et al. 1984 in bean (0.13 mg kg^{-1}) and MacLean 1976 (0.29 mg kg^{-1}). A foliar cadmium concentration in plants from uncontaminated soils was about 0.044 mg kg^{-1} (Hattab 2013). The long-term availability of Cd in plants is related to several soil properties, the presence of other ions in the soil solution, and the plant species.

Due to the competition of Zn and Cd for -SH groups of proteins and enzymes in plants, Chaney (1974) proposed that zinc-cadmium interactions reduce the amount of Cd taken up by plants when the concentration of Cd is less than 1% of the zinc content in the sludge.

Foliar Pb concentrations ranged between (16 – 29 mg kg^{-1}) and (5.7 – 8.6 mg kg^{-1} DW) in both MDN and LPF soils respectively and were above the mean lead content in bean as

reported by Theodoratos et al. (2002) ($0.1 - 5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$). Foliar As and Sb concentrations in bean leaves were ranged from ($46 - 72 \text{ mg kg}^{-1}$) and ($1.48 - 1.52 \text{ mg kg}^{-1}$) respectively. Concentrations of As in plants grown on uncontaminated soils vary from 0.009 to $1.5 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ DW}$, (Kabata- Pendias and Pendias, 2000). It has also been reported that foliar As concentrations (mg As kg^{-1}) described in beans grown on control soils were 5.2 ± 0.2 (Carbonell-Barrachina et al., 1997), 0.38 (Mench et al. 2006), and $1 - 4$ (Macnicol and Beckett, 1985).

In this study foliar As concentrations were many times higher than those reported by above studies. Overall, the total PTE accumulation was following the order: $\text{Zn} > \text{As} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Sb}$. Meers et al. (2007b) also reported that high concentration of Zn was accumulated in the aerial parts of *Phaseolus vulgaris* grown in different soil textures in comparison to other metals such as Cd, Cu, Pb and Mn. Wanat et al. (2014) showed that As concentrations in various organs of plants from the natural vegetation cover were much higher than that of both Pb and Sb.

Liphadzi and Kirkham (2005); Gupta and Sinha (2007a) shown that the process of metal accumulation in plants depends on the concentration of available metals in soils and their mobility and the plant species growing on these soils. The PTE considered readily available for plant uptake are those that exist as soluble components in the soil solution or that are easily desorbed or solubilized by root exudates, representing often only a small portion of the total content of the soil (Blaylock and Huang, 2000), as was found in the present study.

For MDN site, foliar Zn, Pb and Cd mass varied from (25.2 to 59.5), (1.68 to 4.64) and (0.32 to 1.008) mg per plant respectively (Fig. 3.2.2a, b, c). Moreover, for LPF site, foliar As, Pb and Sb mass varied from (3.34 to 5.08), (0.53 to 0.57) and (0.08 to 0.12) mg per plant respectively (Fig. 3.2.2d, e, f).

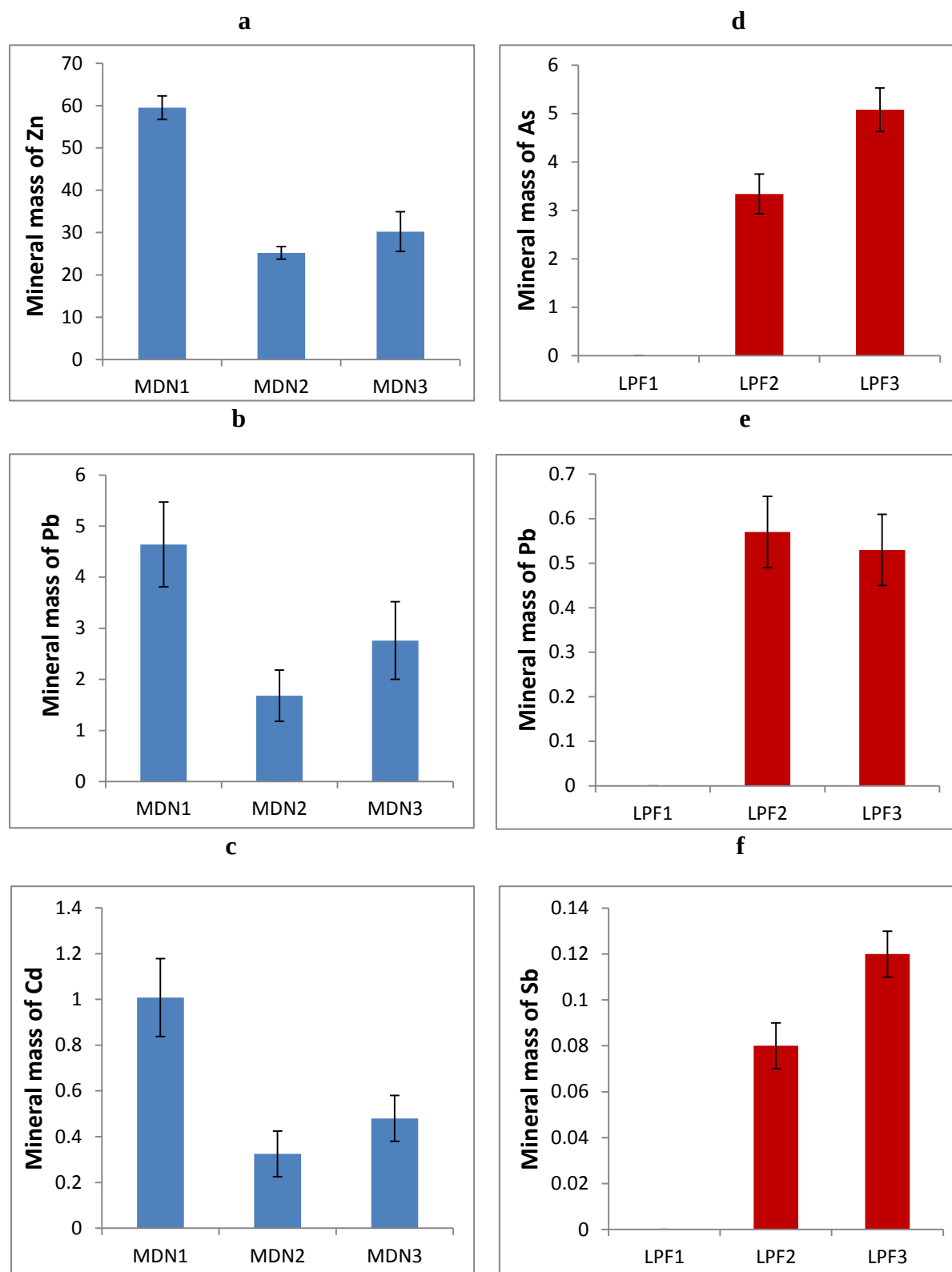


Figure 3.2.2: Mineral masses of Zn, Pb, Cd, As and Sb (mg/plant) in the dwarf bean primary leaves for MDN site (a, b and c) and LPF* site (d, e and f).

* The plants in LPF1 were not growth.

Table 3.2.5: Total potentially toxic elements content in primary bean leaves (DW) after 21 days in the selected (MDN) and (LPF) samples (mg kg⁻¹ DW) (n=3; ± standard deviation).

Sample	Zn	Pb	Cd
	mg kg ⁻¹		
MDN1	372.53±2.80	29.24±2.41	6.30±0.49
MDN2	240.42±1.51	16.98±1.84	3.12±0.18
MDN3	252.77±4.70	23.32±0.57	4.02±1.82
	As	Pb	Sb
	mg kg ⁻¹		
LPF1	Ng	Ng	Ng
LPF2	55.70±4.46	9.61±1.43	1.48±1.21
LPF3	72.76±2.86	6.76±3.73	2.52±1.86

Ng: no growth

3.5. Correlation of soil single extraction and bioavailability

Results of the Pearson's correlation tests used to establish possible relationships between the extractable PTE contents and the concentration of PTE measured in dwarf bean primary leaves and foliar PTE mass are presented in Table 3.2.6 and 3.2.7, respectively. EDTA and DTPA represented the highest Zn extractability (Table 3), while they have present a poor prediction of Zn phytoavailability for both foliar Zn concentrations and foliar Zn mass. In contrast, the other extractions based on diluted chloride solution 0.01M CaCl₂ and nitrate solutions NaNO₃ and NH₄NO₃ provided significant positive correlations ($P < 0.05$) with Zn accumulation and foliar Zn mass. These results correspond to those reporting that neutral salt solutions are more effective in estimating plant availability than the more aggressive tests such as EDTA and DTPA (Gupta and Aten, 1993; Lebourg et al. 1996; Sauerbeck and Styperek, 1985). Sauerbeck and Styperek (1983) also observed that the neutral salt solution is a useful extractant to predict the availability of trace metals in soil, and to be a good predictor of Zn in green beans (Houba et al. 1990).

In the case of Cd, although both EDTA and DTPA exhibited the highest Cd extractability in comparison to other neutral solutions; neither EDTA nor DTPA exhibited

significant correlations with Cd levels in plant leaves and foliar mass. The best predictors for accumulated Cd and Cd mass were found with the results of unbuffered salt solutions CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 . Again, these weak extraction procedures were all correlated significantly ($P < 0.05$) with bean leaves Cd accumulation. Krishnamurti et al. (2000) found that EDTA provided the poorest prediction of Cd availability. This apparent conflict in the reported effectiveness of complexing extractants may be due, at least partially, to differences between studies in the soils organic matter content, soil pH, the amount, source and form of the metal contaminant, and also the age of contaminant. Whitten and Richie (1991); Novozamsky et al. (1992) also reported a good correlation between extracted Cd by 0.01 M CaCl_2 and accumulated Cd in subterranean clover, lettuce and endive plants. Smild et al. (1992) also found high correlations between CaCl_2 extractable Zn and Cd and their concentrations in maize plant. In a comparison of the effectiveness of the five different extractants for the prediction of Cd availability, Novozamsky et al. (1993) proposed using of 0.01M CaCl_2 as extraction reagent for estimation of metals and nutrients in air dry soil samples.

All the five extraction procedures showed significant correlations ($P < 0.05$) with accumulated Pb in dwarf bean leaves for both MDN and LPF soils but not for foliar Pb mass in LPF samples. Similar to findings for both Zn and Cd, the weaker extractions based on neutral salt solutions exhibited the best correlations between chemical extractions and plant PTE accumulation but not for Pb mass in LPF site. Even if many authors (Baxter et al. 1983; Cajuste et al. 2000; Miner et al. 1997; Sistani et al. 1995) concluded that complexing reagents give poor correlation to plant uptake, Gupta and Sinha (2007) reported that EDTA has shown best correlation with metals accumulated in the *Sesamum indicum* grown on different amendment of tannery sludge. Meers et al. (2007b) also found significant interactions of DTPA extractable Pb with plant uptake in the assessment of metals phytoavailability.

Table 3.2.6: Pearson's correlation coefficients between potentially toxic elements concentrations in primary bean leaves and their extractable concentrations by different single extraction procedures for MDN and LPF samples.

Extractant	MDN samples			LPF samples		
	Zn	Pb	Cd	As	Pb	Sb
CaCl ₂	0.99**	0.90**	0.94**	0.86*	0.91*	0.88*
NaNO ₃	0.99**	0.89**	0.80**	0.92**	0.69 ^{NS}	0.64 ^{NS}
NH ₄ NO ₃	0.97**	0.93**	0.84*	0.87*	0.88*	0.78*
EDTA	0.14 ^{NS}	0.81*	0.01 ^{NS}	0.28 ^{NS}	0.89*	0.44 ^{NS}
DTPA	0.47 ^{NS}	0.85**	0.23 ^{NS}	0.42 ^{NS}	0.90*	- 0.48 ^{NS}

**Correlation is significant at the 0.01 level; * correlation is significant at the 0.05 level; NS, no significant correlation.

In the current data set, good correlations were also observed between bean leaves accumulation and weaker extractants based on neutral salt solutions (CaCl₂, NaNO₃ and NH₄NO₃) and extractable As. Again, neither EDTA nor DTPA extraction procedures, aimed at ascertaining soil solution levels yielded consistently significant correlations with plant uptake and foliar As mass. These results are in accordance with findings of Martínez-Sánchez et al. (2011). In contrast to As, NaNO₃ did not exhibit a significant correlation in the case of Sb, whilst, CaCl₂ and NH₄NO₃ presented positive significant correlation between extractable Sb and its level in the dwarf bean leaves and foliar Sb mass. In comparison to complexing agent, the extraction carried out with DTPA and EDTA cannot be considered appropriate for studying Sb mobility since they were not well correlated with plant Sb accumulation.

In general, distinct differences can be observed for the various PTE as significant correlations between the extraction procedures and PTE accumulation in the dwarf bean leaves in both MDN and LPF samples. For all studied PTE the weaker extractants based on neutral salt solution exhibited good correlations with the PTE plant content. Except for Pb, the complexing agents resulted in higher correlations. The best correlation was that of 0.01M

CaCl₂ in all studied samples. An important advantage is that the ionic strength of this extraction solution is similar to that of soil solution. In addition, Ca is generally the most abundant cation present in the soil solution.

Table 3.2.7: Pearson's correlation coefficients between foliar potentially toxic elements mineral mass and their extractable concentrations by different single extraction procedures for **MDN** and **LPF** samples.

	MDN samples			LPF samples		
Extractant	Zn	Pb	Cd	As	Pb	Sb
CaCl ₂	0.99**	0.87*	0.95**	0.80*	0.28 ^{NS}	0.6 ^{NS}
NaNO ₃	0.99**	0.86*	0.93**	0.83*	0.67 ^{NS}	0.21
NH ₄ NO ₃	0.96**	0.91**	0.81**	0.81**	0.03 ^{NS}	0.65*
EDTA	0.2 ^{NS}	0.83**	0.2 ^{NS}	- 0.76 ^{NS}	- 0.15 ^{NS}	- 0.48 ^{NS}
DTPA	0.49 ^{NS}	0.86**	0.04 ^{NS}	0.51 ^{NS}	- 0.24 ^{NS}	- 0.58 ^{NS}

**Correlation is significant at the 0.01 level; * correlation is significant at the 0.05 level; NS, no significant correlation.

4. Conclusion

Different extractants were used to evaluate the best extractant for bioavailability of metals to dwarf bean leaves in two former mining and smelting technosols. The highest PTE (Zn, Cd, Pb, As and Sb) extractabilities were observed for the EDTA solution whereas other extraction media yielded lower extractabilities in comparison to EDTA. The results of Pearson's correlation coefficient analysis showed significant positive correlations between PTE accumulation in bean leaves and extractable metals by the neutral solutions (CaCl₂, NaNO₃ and NH₄NO₃). Poor correlation was found with both EDTA and DTPA extractable metals, except for Pb in both studied sites. In MDN site, Zn, Pb and Cd can be considered the most mobile elements and potentially available to the biosphere, representing therefore a more significant environmental risk than Pb, Sb and As in LPF samples.

In general, the CaCl_2 extraction procedure proved to be a suitable method for the assessing of metal mobility in soils and as it provided a good indication of phytoavailability of all metals under investigation. In accordance with other findings (Novozamsky et al. 1993; Pueyo et al. 2004; Meers et al. 2007b), the use of this procedure is therefore supported for evaluation of plant available PTE in the soil. In investigations dealing with soil ecosystems, it is necessary to take into consideration the content of soluble forms of metals in the soil solution, i.e. susceptible to transfer to the trophic chain, irrespective of the total PTE content.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Baghdad, Iraq) for the financial support, Dr. Domenico Morabito (Université d'Orléans) for microwave digestion and Dr. Cécile Grosbois (Université de Tours) for granulometric analysis.

References

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentasti, E., Sarzanini, C., Barberis, R., (2002) Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environ Pollut* 119:177–193.
- Afnor (1999) Recueil de Normes Françaises. Qualité des sols. Afnor, Paris.
- Anjos, C., Magalhaes, M.C.F., Abreu, M.M., (2012) Metal (Al, Mn, Pb and Zn) soils extractable reagents for available fraction assessment: comparison using plants, and dry and moist soils from the Bracal abandoned lead mine area, Portugal *J Geochem Explor* 113:45–55.
- Black, A., McLaren, R.G., Reichman, S.M., Speir, T.W., Condon, L.M., (2011) Evaluation of soil metal bioavailability estimates using two plant species (*L. perenne* and *T.aestivum*) grown in arrange of agricultural soils treated with biosolids and metalsalts. *Environ Pollut* 159:1523–1535.
- Brown, G.E., Calas, G., (2011) Environmental mineralogy – understanding element behavior in ecosystems. *C R Geoscience* 343:90–112.
- Chaney, R.L., (1975) Recommendation for management of potentially toxic elements in agriculture and municipal wastes. In: Factors involved in land application of agricultural and municipal Wastes. Agriculture Research Service USA. p. 97-120.

- Chojnacka, K., Chojnacki, A., Gorecka, H., Gorecki, H., (2005) Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci Total Environ* 337:175–182.
- Conder, J.M., Lanno, R.P., Basta, N.T., (2001) Assessment of metal availability in smelter soils using earthworms and chemical extractions. *J Environ Qual* 30:1231-1237.
- Cornu, S., Clozel, B., (2000) Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans les sols naturels. Analyse critique. In : *Etude et Gestion des sols*, vol 7, 3rd ed., 179-189.
- Ettler, V., Mihaljevic, M., Sebek, O., Grygar, T., (2007b) Assessment of single extractions for the determination of mobile forms of metals in highly polluted soils and sediments- Analytical and thermodynamic approaches. *Analytica Chimica Acta* 602:131–140.
- Ettler, V., Mihaljevic, M., Sebek, O., Nechutny, Z., (2007) Antimony availability in highly polluted soils and sediments - A comparison of single extractions. *Chemosphere* 68:455–463.
- Fangueiroa, D., Bermonda, A., Santosb, E., Carapuçab, H., Duarteb, A., (2002) Heavy metal mobility assessment in sediments based on a kinetic approach of the EDTA extraction: search for optimal experimental conditions. *Analytica Chimica Acta* 459:245–256.
- Feeney, S., Peterson, J.R., Zenz, D.R., Lue-Hing, C., (1984) National Survey of the Metals Content of Seven Vegetable Species. Dept. of Research and Development-Report No. 84-4 Metropolitan Sanitary District of Greater Chicago, Chicago, Illinois.
- Feng, M.H., Shan, X.Q., Zhang, S.Z., Wen, B., (2005) Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* 59: 939–949.
- Fernandez, J.A., Cerballeria, A., (2002) Biomonitoring metal deposition in Galicia (NW Spain) with mosses: factors affecting bioconcentration. *Chemosphere* 46: 535-542.
- Friberg, L., Nordberg, G.R., Vouk, V.B., (1986) Handbook on the toxicology of metals. New York, NY: Elsevier North Holland, 630.
- Gupta, A.K., Sinha, S., (2007) Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czern. (var. Vaibhav) grown on tannery waste contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 149:144–150.
- Gupta, A.K., Sinha, S., (2007a) Phytoextraction capacity of plants growing on tannery sludge dumping sites. *Biores Technol* 98:1788–1794.
- Gupta, S.K., Aten, C., (1993) Comparison and evaluation of extraction media and their suitability in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentrations in contaminated soils. *Int J Environ Anal Chem* 51:25–46.

- Gupta, S.K., Aten, C., (1993) Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Int J Environ Anal Chem* 51:25-46
- He, M., (2007) Distribution and phytoavailability of antimony at an antimony mining and smelting area. *Human China Environ Geochem Health* 29:209 – 219.
- He, Z.L., Yanga, X.E., Stoffellab, P.J., (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Review J Trace Elem Med Biol* 19:125–140.
- Hornburg, V., Welp, G., Brümmer, G.W., (1995) Behavior of heavy metals in soils. Extraction of mobile heavy metals using CaCl_2 and NH_4NO_3 . *Z Pflanzenernähr Bodenk* 158:137-145
- Houba, V.J.G., Lexmond, T.M., Novozamsky, I., Van Der Lee, J.J., (1996) State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci Total Environ* 178:21–28.
- Houba, V.J.G., Novozamsky, I., Lexmond, T.M., Van der Lee, J.J., (1991) Applicability of 0.01 M CaCl_2 as a single extractant for the assessment of the nutrient status of soils and other diagnostic purposes. *Commun Soil Sci Plant Anal* 23:2029- 2051.
- ISO 11074 (2005) Soil Quality - Vocabulary International Organisation for Standardisation, International Organisation for Standardisation.
- ISO 1999 Soil Quality. Guidance on the ecotoxicological characterisation of soils and soil materials. Guidelines no ISO TC 190/SC 7 ISO/DIS 15799. ISO, Geneva, Switzerland
- Kubova, J., Matus, P., Bujdos, M., Hagarova, I., Medved, J., (2008) Utilization of optimized BCR three-step sequential and dilute HCl single extraction procedures for soil-plant metal transfer predictions in contaminated lands. *Talanta* 75:1110–1122.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., Proix, N., (1996) Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie* 16:201-215.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., Proix, N., (1998) Trace metal speciation in three unbuffered salt solutions used to assess their bioavailability in soil. *J Environ Qual* 27 : 584-590.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., Proix, N., Gomez, A., (1998) Estimation of soil trace metal bioavailability using unbuffered salt solutions: degree of saturation of polluted soil extracts. *Environmental Technology* 19:243-252.
- Li, Z., Shuman, L.M., (1996) Extractability of zinc, cadmium and nickel in soils amended with EDTA. *J Soil Sci* 161:226 – 232.

- Lindsay, W.L., Norvell, W.A., (1978) Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci Soc Am J* 42:421–428.
- Liphadzi, M.S., Kirkham, M.B., (2005) Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals: a technology for rehabilitation of the environment. *S Afr J Bot* 71:24–37.
- Lopez-Sanchez, J.F., Sahuquillo, A., Rauret, G., Lachica, M., Barahona, E., Gomez, A., Ure, M., Muntau, H., Quevauviller, P.h., (2002) Extraction Procedures for Soil analysis. In: Quevauviller P. (ed.) *Methodologies for Soil and Sediment fractionation*. The Royal Society of Chemistry Cambridge pp. 28.
- MacLean, A.J., (1976) Cadmium in different plant species and its availability in soils as influenced by organic matter and addition of lime, P, Cd and Zn. *Can J Soil Sci* 56:129–138.
- McBride, M.B., Nibarger, E.A., Richards, B.K., Steenhuis, T., (2003) Trace metal accumulation by red clover grown on sewage sludge amended soils and correlation to Mehlich 3 and calcium chloride-extractable metals. *Soil Sci* 168:29–38.
- Martínez-Sánchez, M.J., Martínez-López, S., García-Lorenzo, M.L., Martínez-Martínez, L.B., Pérez-Sirvent, C., (2011) Evaluation of arsenic in soils and plant uptake using various chemical extraction methods in soils affected by old mining activities. *Geoderma* 160:535–541.
- McCready, S., Birch, G.F., Taylor, S.E., (2003) Extraction of heavy metals in Sydney harbour sediments using 1 M HCl and 0.05 M EDTA and implications for sediment-quality guidelines. *Aust J Earth Sci* 50:249–256.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., (2000) Soil testing for heavy metals. *Commun. Soil Sci Plant Anal* 31:1661–1700.
- Meers, E., Du, Laing, G., Unamuno, V., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Tack, F.M.G., Verloo, G.M., (2007a) Comparison of cadmium extractability from soils by commonly used single extraction protocols. *Geoderma* 14:247-259.
- Meers, E., Lamsal, S., Vervaeke, O., Hopgood, M., Lust, N., Tack, F.M.G., Verloo, MG., (2005) Assessment of heavy metals bioavailability in a moderately contaminated dredged sediment disposal site and its potential for phytoextraction by *Salix viminalis*. *Environ Pollut* 137:354–364.
- Meers E, Samsonb R, Tack FMG, Ruttens A, Vandegehuchte M, Vangronsveld J, Verloo MG (2007b) Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 60:385–396

- Menzies NW, Donn MJ, Kopittke PM (2007) Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable traces metals in soils. *Environ Pollut* 145:121–130.
- Navarro MC, Pe'rez-Sirvent C, Mart'inez-Sa'nchez MJ, Vidal J, Tovar PJ, Bech J (2008) Abandoned mine sites as a source of contamination by heavy metals: a case study in a semi-arid zone. *J Geochem Explor* 96:183–193.
- Menzies NW, Donn JM, Kopittke PM, 2007. Evaluations of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 145:121-130.
- Negrel P, Grosbois C, Kloppmann W (2000) The labile fraction of suspended matter in the Loire River (France): multi-element chemistry and isotopic (Rb-Sr and C-O) systematics. *Chem Geol* 166:271–285.
- Norvell WA (1984) Comparison of Chelating Agents and Soil Materials. *Soil Sci Soc Am J* 48:1285-1292.
- Novozamsky I, Lexmond ThM, Houba VJG (1993) A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *Int J Environ Anal Chem* 51:47-58.
- Nyamangara J (1998) Use of sequential extraction to evaluate zinc and copper in a soil amended with sewage sludge and inorganic metal salts. *Agri Ecosyst Environ* 69:135–141.
- Pascual I, Antolin MC, Garcia C, Polo A, Sanchez-Diaz M (2004) Plant availability of heavy metals in a soil amended with a high dose of sewage sludge under drought conditions. *Biol Fert Soils* 40:291–299.
- Plaza GA, Nalecz-Jawecki G, Pinyakong O, Illmer P, Margesin R (2010) Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal and hydrocarbon-contaminated sites. *Environ Monit Assess* 163:477–488.
- Pueyo M, López-Sánchez JF, Rauret G (2004) Assessment of CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta* 504:217–226.
- Qasim B, Motelica-Heino M (2014) Potentially toxic element fractionation in technosols using two sequential extraction schemes. *Environmental Science and Pollution Research* 21:5054 – 5065.
- Quevauviller P, Rauret R, Rubio G, Lopezsanchez JF, Ure AM, Bacon JR, Muntau H (1997) Certified reference materials for the quality control of EDTA- and acetic acid-extractable contents of trace elements in sewage sludge amended soils (CRMs 483 and 484). *Fresenius J Anal Chem* 357:611–618.

- Razo I, Carrizales L, Castro J, D'az-Barriga F, Montoroy M (2004) Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water Air Soil Pollut* 152:129–152.
- Rodriguez L, Ruiz E, Alonso-Azcarate J, Rincon J (2009) Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in Spain. *J Environnemental Management* 90:1106–1116.
- Sahuquillo A, Rigol A, Rauret G (2003) Overview of the use of leaching/extraction test for risk assessment of the metals in contaminated soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry* 3:151-159.
- Sauerbeck DR (1991) Plant element and soil properties governing uptake and availability of heavy metals derived from sewage sludge. *Water Air Soil Pollut* 58:227-237.
- Serafimovska JM, Arpadjan S, Stavilov T, Teskova K (2013) Study of the antimony species distribution in industrially contaminated soils. *J Soils Sediments* 13:294 – 303.
- Singh BW (2007) In *Natural Attenuation of Trace Element Availability in Soils*, Hamon R, McLaughlin M, Lombi E (Eds.) Soc Environ Toxicol Chem Pensacola FL 1-18.
- Sloot HA van der, Comans RNJ, Hjelmar O (1996) Similarities in the leaching behavior of trace contaminants from waste, stabilized waste, construction materials and soil. *Sci Total Environ* 178:111-126.
- Smilde KW, Luit BV, Driel WV (1992) The extraction from soil and absorption by plants of applied Zn and Cd. *Plant Soil* 143:215-221.
- Spiter E, Rozsa E, Gruiz K, Tatrai E, Morvai V (2008) Site specific risk assessment in contaminated vegetable gardens. *Chemosphere* 71:1301–1307.
- Sutherland RA (2002) Comparison between non-residual Al, Co, Cu, Fe, Mn Ni, Pb and Zn released by a three-step sequential extraction procedure and a dilute hydrochloric acid leach for soil and road deposited sediment. *Appl Geochem* 17:353–365.
- Szákóvá J, Tlustoš P, Balík J, Pavlíková D, Balíková M (2001) A comparison of suitability of mild extraction procedures for determination of available portion of As, Cd, and Zn in soil. *Chem Listy* 95:179-183.
- Theodoratos P, Papassiopi N, Xenidis A (2002) Evaluation of monobasic calcium phosphate immobilization of heavy metals in contaminated soils from Lavrion. *J Hazard Mater* 94:135–146.
- Ure AM, Quevauviller Ph, Muntau H, Griepink B (1993) Speciation of heavy metal in soils and sediments. An account of the improvement and harmonisation of extraction

- techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *Int J Environ Anal Chem* 51:135-151.
- Uzu G, Sobanska S, Pradere P, Dumat C (2009) Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environ Pollut* 157:1178–1185.
- Vaughan MA, Horlick G (1986) Oxide, Hydroxide, and Doubly Charged Analyte Species in Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry. *Applied Spectroscopy* 40:434-445.
- Wanat N, Austruy A, Joussein E, Soubrand M, Hitmi A, Gauthier-Moussard C, Lenain JF, Vernay P, Munch JC, Pichon M (2013) Potentials of *Miscanthus × giganteus* grown on highly contaminated Technosols. *J Geochem Explor* 126-127: 78-84.
- Wanat N, Joussein E, Soubrand M, Lenain JF (2014) Arsenic (As), antimony (Sb), and lead (Pb) availability from Au-mine Technosols: a case study of transfer to natural vegetation cover in temperate climates. *Environ Geochem Hlth*. DOI 10.1007/s10653-014-9596-5.
- Wang J, Zhang CB, Jin ZX (2009) The distribution and phytoavailability of heavy metal fractions in rhizosphere soils of *Paulownia fortunei* (seem) Hems near a Pb/Zn smelter in Guangdong PR China. *Geoderma* 148:299–306.
- Whitten MG, Ritchie GSP (1991) Calcium chloride extractable cadmium as an estimate of cadmium uptake by subterranean clover. *Aust J Soil Res* 29:215-221.
- Xu D, Zhou P, Zhan J, Gao Y, Dou C, Sun Q (2013) Assessment of trace metal bioavailability in garden soils and health risks via consumption of vegetables in the vicinity of Tongling mining area, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90:103–111.
- Zhang J, Liu J, Li C, Nie Y, Jin Y (2008) Comparison of the fixation of heavy metals in raw material, clinker and mortar using a BCR sequential extraction procedure and NEN7341 test. *Cement and Concrete Research* 38:675–680.

Chapitre 3.3

Utilisation de gradients diffusifs en couches minces, l'eau interstitielle du sol et de plantes indicatrices afin de prédire la phytodisponibilité d'éléments potentiellement toxiques dans des technosols contaminés

Résumé de l'article 3

L'analyse de l'eau interstitielle (*Soil Pore Water (SPW)*) du sol est un moyen très efficace pour évaluer la mobilité et la biodisponibilité des éléments potentiellement toxiques (EPT) dans le sol. En effet, la teneur totale des métaux et métalloïdes dans la phase solide ne prédit pas systématiquement leurs effets toxiques sur les organismes des sols et les plantes.

Dans les articles précédents, plusieurs méthodes chimiques d'extraction (extractions séquentielle et sélective) ont été appliquées afin d'étudier la répartition et la biodisponibilité des EPT dans les sols contaminés. Dans cet article, nous avons étudié la spéciation (mobilité et disponibilité) des EPT par deux autres techniques modernes qui utilisent le DGT ou le Rhizon.

Le DGT, technique gradients de diffusion dans les couches minces (DGT), a été développé par Davison et Zhang dans les années 90, pour la détermination des ions métalliques libres et de leurs complexes labiles présents dans le sol.

Pour réaliser l'objectif de cet article, des échantillons de sols ont été collectés sur deux sites contaminés ; 3 échantillons de sols pour chaque site nommés (MDN1, MDN2, MDN3, et LPF1, LPF2, LPF3) respectivement ont été collectés en surface (0-20 cm de profondeurs, séchés à l'air et tamisés à 2mm) et mis en pots au laboratoire (1kg par pot, trois répliques pour chaque échantillon de sol).

Les concentrations dissoutes totales en éléments potentiellement toxiques (EPT) ont été déterminées dans l'eau interstitielle du sol (SPW) collectée par des échantillonneurs Rhizon après avoir augmenté l'humidité du sol jusqu'à 80% de la capacité au champ. L'intensité de l'exposition du sol a été évaluée par des échantillonneurs intégratifs DGT à base de Chelex-100TM pour Zn, Cd et Pb et ferrihydrite (FH) pour l'As et le Sb, lesquels ont été insérés directement dans le sol humide (80%) de chaque pot pendant 24 heures. La phytodisponibilité des EPT a été caractérisée par la croissance d'haricots nains (*Phaseolus vulgaris*) après 21 jours de croissance. Dans ce test de germination, nous avons déterminé les concentrations foliaires et le minéral masse des EPT accumulés dans les feuilles primaires d'haricots.

Nos résultats ont montré que, pour tous les échantillons étudiés, les concentrations des EPT dans la SPW ont été supérieures à celles déterminées par DGT. Les feuilles primaires d'haricots nains ont montré une forte concentration en Zn contrairement au Pb et au Cd qui ont montré de faibles phytodisponibilités. Bien que l'As et le Sb soient présents dans des concentrations élevées dans les résidus miniers, leurs phytodisponibilités indiquent une très

faible biodisponibilité. Les quantités de Zn, Pb, Cd, As et Sb extraites avec des dispositifs utilisant la DGT sont bien corrélées avec les concentrations totales dissoutes en PTE dans les SPW. Les valeurs les plus élevées de R (ratio de la concentration DGT sur la concentration de l'eau interstitielle du sol) ont été observés pour le Zn, suivie par Cd et Pb, indiquant la capacité du sol à soutenir les concentrations de la solution du sol initiales, lesquelles ont diminué dans cet ordre.

Les concentrations de Zn, Pb, Cd, As et Sb disponibles déterminées par DGT sont corrélées aux concentrations totales dissoutes dans les SPW. De même, les concentrations des EPT disponibles déterminée par DGT et leur concentration totale dissoute dans SPW ont été significativement corrélées avec la concentration foliaire des EPT étudiés.

Finalement nous pouvons dire que l'évaluation de la phytodisponibilité des métaux étudiés en utilisant la SPW est corrélée aux mesures de DGT.

Article 3: Accepted in

(J. Environmental Science and Pollution Research)

Diffusive gradients in thin films, Rhizon soil moisture samplers and indicator plants to predict the bioavailabilities of potentially toxic elements in contaminated technosols

Bashar Qasim^{1,2,*}, Mikael Motelica-Heino¹, Emmanuel Joussein³, Marilyne Soubrand³, Arnaud Gauthier⁴

¹CNRS/ISTO Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, UMR-CNRS 7327 Campus Géosciences, 1A rue de la Férollerie, 41071 Orléans, France.

²Applied Sciences Department, University of Technology, Baghdad, Iraq.

³Université de Limoges, GRESE, EA 4330, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France.

⁴Laboratoire de Génie-Civil et géo Environnement, LGCgE-EA4515, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Abstract

The bioavailabilities and potential remobilization of potentially toxic elements (PTE) such as Zn, Pb, Cd, As and Sb were assessed in contaminated technosols from former mining and smelting sites. The PTE concentrations in soil pore water (SPW) and diffusive gradients in thin films (DGT)-measured concentrations (C_{DGT}) were used to assess the bioavailabilities of PTE and their remobilization in this study. Together with classical Chelex-100 DGT probes to measure Zn, Cd and Pb, novel ferrihydrite-backed DGT, were used for As and Sb measurements alongside with Rhizons for SPW sampling to assess the phytoavailabilities of PTE, a germination test with dwarf beans as a plant indicator was used for this purpose.

Dwarf bean primary leaves showed a high Zn concentration in contrast to Pb and Cd which showed low phytoavailabilities. Despite As and Sb are present in high concentrations in the mine tailings, their phytoavailabilities indicate very low bioavailabilities. The amounts of Zn, Pb, Cd, As and Sb extracted with DGT devices correlated well with the total dissolved PTE concentrations in the SPW. The highest values of DGT R values were observed for Zn, followed by Cd and Pb, indicating the ability of the soil to sustain initial SPW concentrations, which decreased in that order. The highest values of R were observed for Zn, followed by Cd and Pb, indicating the ability of the soil to sustain initial soil solution concentrations, which decreased in that order. Good correlations were also found between each of the dissolved PTE concentrations in the SPW, DGT-measured concentrations of the PTE (C_{DGT}) and the accumulation of the PTE in the dwarf bean primary leaves. It could be concluded that the use of soil solutions and DGT measurements may be considered to be a good method to predict the bioavailabilities of PTE in contaminated technosols.

Keywords: DGT, Soil pore water, Bioavailability, Technosol, Potentially toxic elements

1. Introduction

Mining activities and the metal processing industry are areas of main concern due to their generation of waste rich in potentially toxic elements (PTE). The result of these activities is the formation of mining and industrial wastes stored as tailings. In fact, mining and smelting activities produce large amounts of rock and tailing wastes with high heavy metal contents, resulting in the contamination of water and agricultural soil (Wang et al., 2009). In particular, the ore extraction process is accompanied by rock extraction, which contains mineral phases potentially rich in PTE such as arsenic. Additionally, the alteration of the materials from tailings, i.e., primary phases leading to the formation of secondary phases, which are potentially more stable in supergene conditions, may control the mobilities of PTE in the environment.

The risks due to PTE in terrestrial ecosystems are currently evaluated on the basis of their total soil concentrations. Many authors have discussed that the total metal content in the solid phase often does not predict the toxic effects on soil organisms and plants well (Crommentuijn et al. 1997; Plaza et al., 2010), which might be due to the dependence of the bioavailabilities of PTE in the soil on the soil properties (e.g., pH, redox potential, CEC, amount and nature of organic matter and soil textural class).

In reference to this last point, the concept of bioavailability is relatively complex and reflects a dynamic process (Peijnenburg et al. 1997) involving the following two distinct notions: (i) stability of the thermodynamic equilibrium of metals at the liquid/solid interface (also known as "environmental availability") and (ii) the physiological processes of absorption by the target organisms (also called "environmental bioavailability"). An accurate assessment of the bioavailability must consider the possibilities of both the physico-chemical desorption of PTE as well as the biological receptors they can reach.

Water soluble PTE can easily be mobilised and may be considered as highly bioavailable (Seguin et al. 2004). Chapman et al. (2002) concluded that soil pore water (SPW) analysis can be an effective assessment tool. Sampling of SPW has been carried out satisfactorily in numerous pot experiments in both laboratory and greenhouse conditions (Knight et al. 1998). Rhizon samplers can be used to remove SPW whilst the physical structure of the soil remains intact. Additionally, the SPW removed by Rhizon samplers probably represents the fraction of soil water that is taken up by plants, and such SPW samples have been recommended for use in ecotoxicity tests (Tiensing et al. 2001). This technique has proven to be effective, relatively straightforward and inexpensive compared to other procedures for extracting SPW (Datta and Young, 2005). The PTE bioavailabilities in soil and sediments can also be assessed by several groups of extraction solutions (e.g., by 0.01M CaCl_2 , 1M NH_4NO_3 or 0.005M DTPA) or by measuring soil solution concentrations in water extracts (Gray et al. 1999; Pueyo et al. 2004).

Alternatively, another approach based on the chemical measurement of the PTE in soil by the use of a gel technique, the diffusive gradients in thin films (DGT) method, has been developed. The DGT technique was developed for measuring PTE concentrations in water, but it has also been used in soil and sediments to measure the pore water concentrations and metal resupply fluxes from the solid phase (Zhang et al., 1995; Alma's et al., 2006). This technique is based on the diffusion of metal(loid)s through a diffusion layer to a binding phase where they are concentrated (Davison and Zhang, 1994; Zhang and Davison, 1995; Hooda et al., 1999). Whereas standard DGT incorporates Chelex-100 cation exchanger, recently, ferrihydrite-backed (FH) DGT has been reported for the measurement of anions such as inorganic arsenic, antimony and molybdenum (Zhang et al., 1998; Fitz et al., 2003; Osterlund et al., 2010).

Finally, plants themselves can be used as bioindicators for the assessment of toxicity in terrestrial ecosystems (Gorsuch et al., 1991). Adriano (2001) classified plants into three types

(indicators, accumulators and excluders) depending on their PTE uptake behaviour. Indicator plants can effectively be used as naturally available monitoring systems (Bargagli, 1998). Additionally, dwarf beans have been extensively used for the assessment of PTE phytotoxicities based on growth experiments in the laboratory (Vangronsveld and Clijsters, 1992; Bleeker et al., 2003; Ruttens, 2006; Meers et al., 2007b).

The aim of this work was to assess the phytoavailabilities and potential remobilization of PTE such as Zn, Pb, Cd, As and Sb in contaminated technosols with laboratory experiments based on both Chelex-100 DGT and FH DGT probes, SPW measurements and the concentrations of PTE in dwarf bean primary leaves.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling

Two contaminated areas, a former smelting area and a former mining area, were selected for this study. The first one is metallophyte grassland located at Mortagne-du-Nord (MDN) in Northern France. The area is adjacent to the former metallurgical site occupied for over 60 years by a zinc smelting unit linked to a sulfuric acid production unit and a lead smelting unit (Thiry and van Oort 1999). The second is the former mine tailings of La Petite Faye (LPF) located 60 km northeast of Limoges (France), where approximately 35000 t of waste from a former gold mine have been stored for over 45 years. This mining waste is characterized by high total concentrations of PTE such as, Pb and Sb (Néel et al. 2003; Wanat et al., 2013).

Three locations from each site named MDN1, MDN2, MDN3 and LPF1, LPF2, LPF3, respectively, were selected for this study according to the concentration levels of the PTE such as Zn, Pb and Cd for MDN and As, Sb and Pb for LPF respectively across a concentration gradient and spatial distribution of the vegetation cover. At the MDN site, the vegetation cover essentially consists of *Arabidopsis hallari* and *Avena sativa* L., whereas at the LPF site, *Graminea*, *Equisetum telmateia*, *Betula pendula* *Pteridium aquilinum* and *Rubus fruticosus* were present (Wanat et al., 2013, 2014).

The collected surface soil samples (0-20 cm) from each location were oven-dried at a constant temperature of 40°C, manually homogenized, sieved using a 2 mm mesh sieve to remove gross plant matter, and then used for the determination of the soil physico-chemical properties. The physicochemical properties of the soil were characterized by routine soil

testing laboratories according to standardized French (AFNOR 1999) or international (ISO 1999) procedures. The pH and electrical conductivity (EC) of each sample were determined in distilled water extracts (1:2.5 w/v) (NF ISO 10390 (2005)). The total organic carbon (TOC) concentrations were determined according to ISO (1999). The soil texture analysis was based on grain size analysis, which was performed with a Malvern Mastersizer 3000 laser diffraction microgranulometer (measurement range between 0.02 and 3000 μ m).

2.2 Soil total PTE analysis

The soil total PTE concentrations were determined by the method of aqua regia/hydrofluoric acid digestion (Zhang et al. 2008). Approximately 1g of each sample was accurately weighed into a 100 ml teflon beaker. 20 ml of aqua regia (HNO₃: HCl, 1:3 v/v) and 20 ml of concentrated hydrofluoric acid were added to the beaker, heated to dryness, then cooled to room temperature.

One milliliter of concentrated nitric acid and a further 20 ml of deionized water were added and the beaker was heated again on a hot plate at 90–100°C for 1h, and then cooled to room temperature. The solution filtered through a 0.45 μ m cellulose nitrate filter, diluted to volume with deionized water in a 100 ml volumetric flask. The PTE concentrations in the solutions were determined by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP–MS, Finnigan Element XR, Thermo Electron, Germany) using a Twinnabar cyclonic spray chamber and a Micromist nebulizer (Glass Expansion, Melbourne, Australia). The accuracy and precision of analyses was checked by performing calibrations with a standard reference water solution (Fisher scientific).

2.3. Germination test and plant analysis

A pot experiment was conducted with the contaminated technosols from the MDN and LPF sites. Approximately 1 kg of soil from each sub-location was potted in plastic plant pots after homogenizing and sieving the soil to pass through a 2-mm mesh sieve. Four dwarf bean seeds per pot were sown in all of the pots and cultivated for 21 days in controlled conditions (16 h light/8 h darkness regime, 25°C/21°C). The photoperiod was set at a 16 h light/8 h darkness regime, with an approximate photon flux of 150 μ E m⁻²s⁻¹. The soil moisture was adjusted at 65% of the potential water holding capacity with demineralized water by weighing every second day.

The plants were harvested 21 days after sowing. The above ground plant tissues (primary leaves) were cut and rinsed thoroughly with double deionized water. Washed leaves were dried at 80°C for 72 h before recording the dry matter yield. Dried plant leaves were ground with a laboratory grinder and digested with a pressurized closed-vessel microwave system (Multiwave 3000, Anton Paar GmbH, Germany). Before each digestion, the microwave polyfluoroacetylene (PFA)-teflon vessels were cleaned with 10 ml of aqua regia (HNO₃/HCl, 1:3 v/v), heated for 20 min. at 200°C and then rinsed with double deionized water. After the microwave-assisted digestion procedure was optimized, the following conditions were employed: samples were accurately weighed to 200mg (± 0.5 mg) in the microwave vessels.

The digestion program consisted of a 15min gradual increase to 200°C, a 15min digestion step at 200°C and 1200 W and then a cooling stage. The acid mixtures used were selected according to previous reports for trace elemental analysis in soil. After cooling to room temperature, the samples were filtered through 0.45 μ m filter paper and diluted to 50 ml with ultra-pure water (18M Ω cm⁻¹). Blanks were processed via a method identical to the sample processing. HR-ICP-MS measurements were carried out to determine the PTE concentrations as described before and their mineral mass (mg plant⁻¹), calculated by multiplying the biomass of primary leaves (mg DW plant⁻¹) by their element concentration (mg DW kg⁻¹).

2.4. Soil pore water sampling

SPW was collected by using Rhizon soil moisture samplers (Rhizosphere Research Products, Wageningen, The Netherlands). Measurements were made in three replicates. Two Rhizon soil moisture samplers were placed in each pot and approximately 20ml of soil pore water was extracted.

The collected soil pore water was separated into several sub-samples for analysis. The soluble metal(loid)s (Metal_{sol}) were acidified with concentrated HNO₃ and stored at 4°C prior to the concentrations of the metals being determined by using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Other aliquots of SPW were used for determining the dissolved organic carbon (DOC) using a Teckmar-Dohrman Phoenix 8000 TOC analyser, and the concentrations of the major cations (Na⁺, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺) and anions (NO₃⁻, SO₄²⁻, and Cl⁻) were analysed by ionic chromatography (Dionex ICS-2000, Sunnyvale, CA using a CS16A column for measuring the cations and an AS17 column for measuring the anions).

Before using the samplers, they were cleaned with 5% HNO₃ and then washed twice with deionized water.

2.5. DGT deployment

DGT measurements were made for both the MDN and LPF soil samples. All experiments were carried out in three replicates. The following two types of DGT devices were used in this study: the standard Chelex-100 DGT (Zhang et al., 2001) was used for Zn, Cd and Pb, whilst the ferrihydrite-backed (FH) DGT was used for As and Sb measurements. DGT units (DGT soil samplers (LSNA), Lancaster, UK) consisting of a plastic base (25-mm-diameter piston) loaded with a protective membrane filter (0.45-μm cellulose nitrate membrane filter, 0.14 mm thick), a diffusive gel disc (0.82 mm thick) and a resin (Chelex-100 resin (for Zn, Pb and Cd) and FH resin (for As and Sb)) were used to measure the concentrations of the PTE (C_{DGT}) in the soil samples. While there is now strong evidence for the capability of DGT to assess metal concentrations in soil (Davison et al., 2000), more recent work with FH-based binding gel has shown that DGT is also robust for the assessing the inorganic species of As (Mojsilovic et al., 2011; Moreno-Jimenez et al., 2013) and Sb (Östelund et al., 2010) in soil samples.

Before DGT deployment, soil slurries were prepared by the addition of deionized water to adjust the slurries to 80% WHC (water hold capacity). The soil slurry pots were covered with parafilm and left for 24h to achieve equilibration. The DGT units were inserted gently 1.5 cm deep into the soil slurries at 80% WHC and pushed gently into the surface after having carefully smeared some moist soil on the contact membrane to assure the absence of air bubbles and the full contact of the device with the soil solution. The container and DGT device were covered with parafilm to limit evaporation. After maintaining the device at room temperature (±20°C) for 24h, DGT devices were washed with distilled water to remove the soil particles that adhered to the DGT device. Subsequently, DGT devices were opened to remove the filter and the diffusive membrane. The Chelex100 resin gels were eluted by 1ml of 1M HNO₃, while the FH resin gels were eluted by 1ml of 1M HCl. The eluent was diluted 10 times and analysed by ICP-MS. The mass of the metals that accumulated in the resin gel (M, μg) was obtained by the following equation (Zhang et al., 2002):

$$M = Ce (V_{HNO_3} + V_{gel})/fe$$

where C_e is the concentration in the eluent ($\mu\text{g ml}^{-1}$) measured analytically, V_{HNO_3} is the volume of HNO_3 (1ml), V_{gel} is the volume of gel (0.15ml) and f_e is the elution factor for the metals.

The time-averaged concentration at the interface soil diffusive layer (C_{DGT} , $\mu\text{g l}^{-1}$), can be calculated from the following equation:

$$C_{\text{DGT}} = \frac{M \Delta g}{D t A}$$

where Δg is the diffusion layer thickness (0.094 cm), D is the diffusion coefficient of metal in the diffusion layer ($\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), t is the deployment time (s) and A is the area of the gel membrane exposed to the soil (3.14 cm^2).

Comparison of C_{DGT} with the independently measured initial soil solution concentration C_{sol} (both determined at the same soil moisture content 80% WHC) provides a ratio (R) that gives an indication of the extent of depletion of SPW concentrations at the DGT interface (Ernstberger et al., 2002).

$$R = \frac{C_{\text{DGT}}}{C_{\text{spw}}}$$

The SPW concentrations adjacent to the DGT device become depleted as the metal(loid)s are removed locally by the DGT that acts as a sink. The local depletion in the SPW concentrations therefore induces remobilisation of solutes from the soil solid phase. Resupply of metal(loid)s from particles to SPW counteracts the depletion which is most pronounced when there is no resupply from the solid phase.

The resupply flux of metals from the solid phase to the pore water depends on the ability of the labile metal pool of the solid phase to be released into the pore water. The accumulated mass of metal in the Chelex resin is, thus, partly governed by the resupply flux of metals from the sediments to the DGT device (Nia et al., 2011).

2.6. Reagents and standards

All of the reagents used in this study were products of analytical-grade quality (Merck pro-analysis, Darmstadt, Germany). All of the solutions and dilutions were prepared using doubly deionized water ($18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) (Thermo Scientific Barnstead Easy Pure II systems). Standard stock solutions of 1000 mg l^{-1} of different elements were prepared from metal wires or salts with purities higher than 99.998% (VWR international, BDH Prolabo ICP Standards, Belgium). Diluted standard working solutions were prepared from these standard stock

solutions on a daily basis. All of the laboratory glassware and plasticware was rinsed three times with double deionized water after being soaked in a HNO_3 (10%, v/v) bath for 24h.

2.7. Statistical analysis

All of the tests were performed in three replicates, and the results are presented as the mean $\pm$ standard deviation. The data were statistically analysed using Statistica 10 package software. Statistical analysis including Pearson's correlation coefficients were used to determine the relationships between the concentrations of the PTE measured by the DGT technique (C_{DGT}), in soil pore water (C_{spw}), and in dwarf bean primary leaves (C_{plant}) as well as the total soil PTE concentrations ($C_{\text{tot.}}$).

3. Results and discussion

3.1. Soil properties

The main physicochemical properties of the soil samples are summarized in Table 3.3.1. Soil samples from MDN and LPF differed in their main physical and chemical properties. The pH values of the MDN samples were acidic to slightly acidic and ranged from 6.1 to 6.9, while the pH values of the LPF samples were acidic and ranged from 3.6 to 5.7. The total organic carbon (TOC) ranged from 3.3 to 6.45% and 0.30 to 1.67% for the MDN and LPF samples, respectively. The cation exchange capacity varied from 6.7 to 8.5 $\text{cmol}(+)\text{kg}^{-1}$ and 18.3 to 39.7 $\text{cmol}(+)\text{kg}^{-1}$ for the MDN and LPF samples, respectively.

3.2. Physico-chemical analysis of the SPW

Results of the SPW physicochemical parameters are displayed in Table 3.3.2. A noticeable difference in the pH of the SPW was observed for the MDN and LPF soil samples. The pH values of the soil solutions of MDN samples were slightly acidic (6.08–6.90), whilst the pH values of the LPF samples were acidic (3.66–5.73). In fact, there is no significant difference between the pH values before and after bean cultivation; this may be attributed to the low exudates concentration released by plant roots, which did not alter the pH value.

Differences between the soils types were also observed on the DOC in the SPW. The highest DOC concentration for the MDN samples was for MDN3. The same pattern was also observed for the LPF samples.

Table 3.3.1: Physico-chemical characteristics of the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) and La Petite Faye (LPF) (n=3; $\pm$ standard deviation)

Paramètres	MDN samples			LPF samples		
	MDN1	MDN2	MDN3	LPF1	LPF2	LPF3
pH-H ₂ O	6.92 $\pm$ 0.12	6.35 $\pm$ 0.34	6.14 $\pm$ 0.17	3.65 $\pm$ 0.05	4.93 $\pm$ 0.42	5.75 $\pm$ 0.11
EC (μ S.cm ⁻¹)	112.2 $\pm$ 3.8	112.6 $\pm$ 7.41	113.71 $\pm$ 1.93	258.41 $\pm$ 4.10	200.51 $\pm$ 3.64	150.81 $\pm$ 3.84
CEC (cmol(+) kg ⁻¹)	7.21 $\pm$ 0.70	8.53 $\pm$ 0.25	6.74 $\pm$ 1.21	18.38 $\pm$ 0.70	29.14 $\pm$ 0.20	39.73 $\pm$ 0.31
TOC %	3.35 $\pm$ 0.94	4.39 $\pm$ 0.14	6.45 $\pm$ 0.10	0.34 $\pm$ 0.82	0.47 $\pm$ 0.47	1.67 $\pm$ 0.83

EC: electrical conductivity, OM: organic matter, TOC: total organic carbon, CEC: cation exchange capacity.

Table 3.3.2: Soil pore water physicochemical parameters for the MDN and LPF samples

			Cations (mg l ⁻¹)					Anions (mg l ⁻¹)		
Sample	pH	DOC	Na ⁺	NH ₄ ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻²
MDN1	6.90	18.4	5	2	1.9	11.9	17.8	6.4	55.6	15.9
MDN2	6.33	20.2	5.2	4	1.4	11.4	16.4	2.5	72.2	14
MDN3	6.08	24.6	4.9	3.5	4.5	9	20.8	2.1	103.4	22.6
LPF1	3.66	36	31.3	5.6	5.7	13.3	33.5	26.4	141.6	155.6
LPF2	4.91	51.9	11.5	1.5	4.1	11.8	20.7	13	89.3	28.3
LPF3	5.73	143.5	29	6.2	12.7	71.4	86.1	45.2	393.4	109

DOC: dissolved organic carbon

The concentrations of the major cations and anions in the SPW varied according to the locations for both the MDN and LPF samples. Ca²⁺ appeared to be the main cation, and it showed the highest concentration among the other cations. The highest Ca²⁺, NH₄⁺, Mg²⁺, K⁺

and Na^+ concentrations were observed for the LPF3 sample, whereas their concentrations were comparable among the MDN samples. The SPW of the LPF samples was characterized by higher anion (Cl^- , NO_3^- and SO_4^{2-}) concentrations than the MDN samples.

3.3. Concentrations of PTE in SPW and as measured by DGT

The Zn, Pb, Cd, As and Sb total soil concentrations, total dissolved concentrations in the SPW, DGT measured concentrations, concentrations in plant leaves and R-values for both the MDN and LPF samples are summarized in Tables 3.3.3 and 3.3.4, respectively. Columns represent the average of three replicates ($\pm$ standard deviation).

The total dissolved concentrations of Zn in the SPW for the MDN samples were different. The largest solubilization of Zn was observed for MDN1 (with the highest total Zn content), which presents a higher Zn concentration in soil pore water compared to both MDN2 and MDN3. Otherwise, the minimum solubility of Zn was reached for MDN2 (with the lowest total Zn soil concentration), which also holds the lowest Zn soil pore water concentration. The highest DGT measured Zn concentrations were observed for MDN1 and MDN3, whereas the lowest was observed for MDN2, which is in agreement with the observations for the SPW concentrations.

The R-value ($R = \frac{C_{DGT}}{C_{sol}}$) is a measure of the extent of replenishment of the metal in the soil solution at the DGT interface. The lower value for C_{DGT} than for C_{spw} (Fig. 1) could also be because only a fraction of the metal species was labile (Vandenhove et al. 2007).

The R-values for Zn in all studied samples varied between 0.5 and 0.72, which suggest significant resupply from the solid phase. Degryse et al., (2003) observed R-values from 0.02 to 1.5 for Zn-contaminated soils. This ratio decreased with a decreasing distribution coefficient (K_d) of Zn in the soil, which is in agreement with the predictions of the DGT induced fluxes in soils (DIFS) model.

In MDN3, which had high R-values, the soil pore water Zn concentrations were readily replenished after being employed with DGT. DGT was also used to measure the distribution and rates of exchange of Zn, Cd, and Ni between the solid phase and solution in five different soils with various textures, pH values and TOC values (Ernstberger et al., 2005). In a previous study the DIFS model (DGT induced fluxes in soils) (Ernstberger et al. 2002) was used to derive distribution coefficients for labile metals (K_{dl}) and the rate at which the soil system can supply a metal from the solid phase to solution. The major factor influencing the K_{dl}

values for Zn and Cd was the pH but their association with humic substances in the solid phase also appeared to be important.

A similar picture was observed for the concentrations of Pb in the SPW and DGT measurements for both the MDN and LPF soil samples. Again, the highest Pb concentrations were observed for MDN1 and LPF1 followed by MDN3 and LPF2, while the lowest Pb concentrations were observed for MDN2 and LPF3, respectively. The R-values for Pb ranged between 0.43 and 0.58 and between 0.11 and 0.35 for both MDN and LPF samples, respectively, suggesting a moderate resupply from the solid phase. Pb usually shows restricted mobility in soil, which is reflected here by the low concentrations of this metal in the SPW. Nolan et al., (2003) found low Pb concentrations in centrifuged extracted pore waters from acid contaminated soils. Clemente et al., (2008) also found a low Pb concentration in the SPW of a multi-element contaminated soil.

In the case of Cd, the soil sample with the largest Cd concentration (MDN1) also showed the highest SPW concentration, and the soil sample with smallest Cd content (MDN3) showed the lowest SPW concentration. A similar pattern was observed for the Cd concentrations measured by DGT for the studied samples with the exception of MDN2, which presents the lowest Cd concentration in comparison to both MDN1 and MDN3. The R-values for Cd ranged between 0.49 and 0.7.

The lower value for C_{DGT} than for C_{spw} (Fig. 3.3.1) could also be because only a fraction of the metal species, which are positively or negatively charged, will be attracted by the oppositely charged resin (Vandenhove et al., 2007).

The highest values of R were observed for Zn, followed by Cd and Pb, indicating the ability of the soil to sustain initial soil solution concentrations, which decreased in that order.

Table 3.3.3: Soil total metal concentration (C_{tot}), total dissolved concentration of metal in the soil pore water (C_{spw}), DGT measured concentration (C_{DGT}), concentration of metal in bean leaves ($C_{\text{plant, DW}}^{\text{a}}$), metal mineral mass (C_{Mm}) and R-value^b for the MDN samples.

Element	Unit	MDN1	MDN2	MDN3
Zn _{tot}	mg kg ⁻¹	7726±12	3114±11	3127±10
Zn _{spw}	µg l ⁻¹	4940±37	3770±23	4781±49
Zn _{DGT}	µg l ⁻¹	3486±27	2419±32	3456±16
Zn _{plant}	mg kg ⁻¹	372.5±2.8	240±1.5	252.7±4.7
Zn _{Mm}	mg plant ⁻¹	59.5±1.2	25.2±0.9	30.2±1.7
R	—	0.70	0.64	0.72
Pb _{tot}	mg kg ⁻¹	3551±12	881±9	874±8
Pb _{spw}	µg l ⁻¹	173±18	122±4	151±6
Pb _{DGT}	µg l ⁻¹	101±7	53±6	82±7
Pb _{plant}	mg kg ⁻¹	29.2±2	16±1	23.3±0.5
Pb _{Mm}	mg plant ⁻¹	4.6±0.4	1.6±0.1	2.7±0.8
R	—	0.58	0.43	0.54
Cd _{tot}	mg kg ⁻¹	72±13	64±8	51±8
Cd _{spw}	µg l ⁻¹	178±13	141±8	139±7
Cd _{DGT}	µg l ⁻¹	126.2±6	69.7±9	92.7±3
Cd _{plant}	mg kg ⁻¹	6.30±0.4	3.12±0.1	4±1
Cd _{Mm}	mg plant ⁻¹	1±0.04	0.32±0.01	0.48±0.09
R	—	0.7	0.49	0.66

^a DW: dry weight; ^b $R = \frac{C_{\text{DGT}}}{C_{\text{spwl}}}$

The highest extracted amounts of As were observed for LPF3, which had with the lowest As concentrations, followed by LPF2, whilst, in the contrary, the lowest extracted amounts were observed for the most highly contaminated soil sample (LPF1). Similarly to As, the highest amounts of extracted Sb were also observed for LPF3 followed by LPF2, and the lowest concentration was for LPF1, which had the highest Sb concentration.

The DGT measured concentrations (C_{DGT}) for both As and Sb were in agreement with the observations for the soil pore water As and Sb concentrations. Both SPW and labile pool (DGT) measurements showed that As and Sb were considerably less soluble in comparison to their total soil contents. That finding might be explained by the fact that previous results of sequential extraction showed that the majority of both As and Sb was bound in the residual

phase, especially for both LPF1 and LPF2 (Wanat et al., 2013, 2014), so that very small proportions were water soluble. These results were in agreement with those of Beesley et al., (2010a), as they found that small amounts of As were extracted from both the column leachate and soil pore water in all of the soil profiles.

Table 3.3.4: Soil total metal concentration (C_{tot}), total dissolved concentration of metal in the soil pore water (C_{spw}), DGT measured concentration (C_{DGT}), concentration of metal in bean leaves ($C_{\text{plant, DW}}^{\text{a}}$), metal mineral mass (C_{Mm}) and R-value^b for the LPF samples.

Element	Unit	LPF1	LPF2	LPF3
As _{tot}	mg kg ⁻¹	83941±11	37462±10	2672±4
As _{spw}	µg l ⁻¹	1611±47	3827±56	5040±40
As _{DGT}	µg l ⁻¹	718±23	1918±26	2427±23
As _{plant}	mg kg ⁻¹	Ng	55.7±4	72.7±2.8
As _{Mm}	mg plant ⁻¹	Ng	3.34±0.81	5.08±1.1
R	—	0.44	0.5	0.48
Pb _{tot}	mg kg ⁻¹	16109±14	8541±9	367±9
Pb _{spw}	µg l ⁻¹	462±9	39±2	21±1
Pb _{DGT}	µg l ⁻¹	49±2	14±1	2.7±0.2
Pb _{plant}	mg kg ⁻¹	Ng	9.6±1	6.7±3
Pb _{Mm}	mg plant ⁻¹	Ng	0.57±0.04	0.53±0.13
R	—	0.1	0.35	0.12
Sb _{tot}	mg kg ⁻¹	863±12	493±9	107±13
Sb _{spw}	µg l ⁻¹	65±3	37±4	136±12
Sb _{DGT}	µg l ⁻¹	17±2.7	8.2±1	28±2
Sb _{plant}	mg kg ⁻¹	Ng	1.48±0.2	1.52±0.8
Sb _{Mm}	mg plant ⁻¹	Ng	0.08±0.01	0.12±0.03
R	—	0.26	0.22	0.20

^a DW: dry weight; ^b $R = \frac{C_{\text{DGT}}}{C_{\text{spw}}}$; ng: no growth

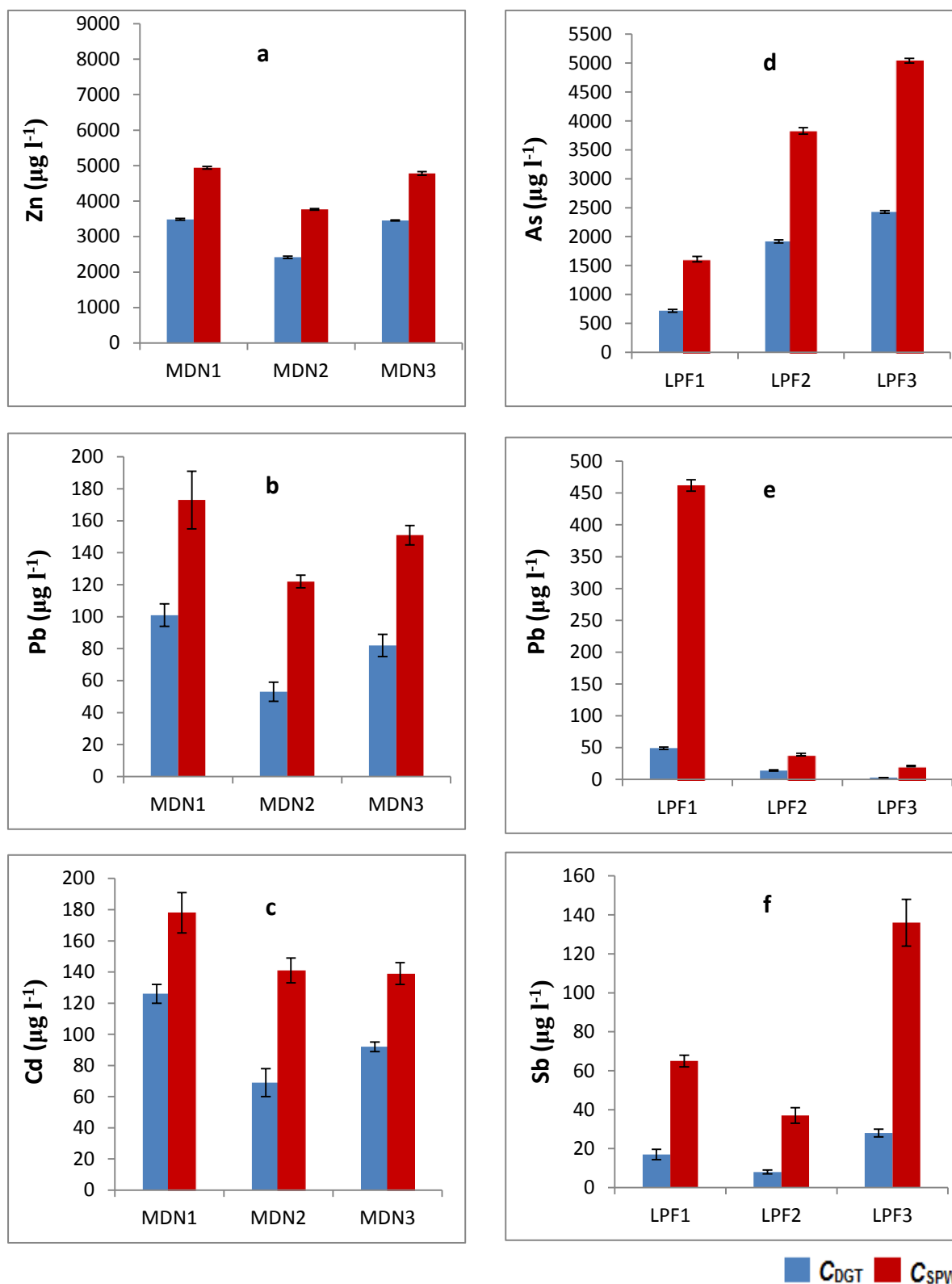


Figure 3.3.1: DGT measured concentration (C_{DGT}), and concentration in the soil solution (C_{SPW}) for studied PTE in both MDN (a, b, and c) and LPF samples (d, e, and f).

3.4. PTE phytoavailabilities

The phytoavailability is the capacity of a plant for the adsorption of soil or sediment components, and it is dependent on many factors, such as the plant species, total metal concentrations, adsorption and desorption from mineral surfaces (Adriano, 1986; Li and Thornton, 1993). The pot experiment of dwarf beans grown in the studied samples for 21 days showed an accumulation of varying amounts of PTE in the primary leaves of the dwarf beans. On average, the total biomass of the leaves after 21 days varied between 0.06 and 0.16 g/plant dry weight. In the present study, the range and distribution of the observed concentrations for all of the PTE in the primary leaves were broad.

Dwarf bean primary leaves showed a high Zn concentration, indicating that this metal was phytoavailable and incorporated into plant leaves. On the contrary, Pb and Cd showed low phytoavailabilities, suggesting that these metals, although present in mining and tailings in high concentrations, were only slightly absorbed by plant leaves. It may also be suggested that the remobilizing abilities of Pb and Cd from roots to shoots were much lower than that of Zn. As and Sb are present in high concentrations in LPF mine tailings, but their phytoavailabilities indicate very low bioavailabilities. These data are in agreement with those of Casado et al., (2007) and Levresse et al., (2012) for the arsenic and antimony uptake by plants in an abandoned mining area in NW Spain and Mexico, which also concluded that these metals have low bioavailabilities in mine waste.

These low phytoavailabilities can be explained by the association of As and Sb with stable phases, such as sulfide minerals, iron oxides or the residual phase (Gal et al., 2007; Denys et al., 2008).

The mobility of PTE as well as their bioavailability depends on their interactions between the solid and liquid phases in soils. In fact, many mechanisms such as for example; sorption/desorption reactions, precipitation, redox reactions, as well as the complexation reaction with organic or inorganic ligands can affect or control the PTE bioavailability as well as their toxicity. Many factors such as pH, soil organic matter, chemical speciation as well as root exudates are affect these mechanisms and influence the behavior of chemical elements (Impellitteri et al. 2001; Carrillo et al. 2006).

3.5. Correlation between the concentrations of PTE in soil solutions, as measured by DGT devices and accumulated in plant leaves

A correlation analysis was performed to investigate the relationships between each of the concentrations of PTE in soil pore water (C_{spw}), as measured by the DGT technique (C_{DGT}), in dwarf bean primary leaves (C_{plant}) and in the total soil (C_{tot}).

The results of Pearson's correlation test to establish the relationships between the above variables are presented in Table 3.3.5.

In our study, we observed a significant relationship between the Zn concentrations in soil pore water and each of the Zn concentrations measured by DGT as well as the Zn concentrations accumulated in the dwarf bean primary leaves. Additionally, the Zn concentrations as measured by DGT were linearly correlated with the Zn concentrations accumulated in dwarf bean primary leaves. Conversely, there was no significant correlation with the total Zn concentrations in the soil samples. However, the Zn contents in plant leaves correlated well with the total soil Zn concentrations.

A good correlation between C_{DGT} and SPW concentrations has been observed by many authors. Degryse et al., (2003) found a significant linear correlation between the Zn pore water concentrations and the DGT-measured Zn concentrations of Zn amended soil samples. Zhang et al., (1998) found significant linear correlations between C_{DGT} and the concentrations of Zn, Cd, Ni and Cu in the pore water of soil amended with sludge. Koster et al., (2005) also found that the DGT-extractable Zn concentration correlated well with the extractable Zn concentration for Zn-amended soil samples. Many authors have also noted the relationship between the concentrations of PTE in SPW, as measured by DGT and in plant shoots.

The effective concentrations (CE) of Zn measured by the technique of DGT were compared along with the total concentrations of Zn and the concentrations of Zn in soil solutions to the Zn concentrations in plants (Zhang et al., 2004). Correlations between the concentration of Zn in the plants and the measured soil parameter followed the order CE>soil solution>total Zn. Muhammad et al., (2012) observed that both the Zn and Cd concentrations in *Plantain* shoots were strongly correlated with their concentrations in both the soil pore water and as measured by DGT devices. Conversely, Song et al., (2004) also observed a good relationship between the Cu contents in the shoots of both *Silene vulgaris* and *Elsholtzia splendens* and the Cu concentrations in soil pore water, whilst the correlation was less with Cu_{DGT} .

Cd contents measured by DGT showed a positive correlation with those found in dwarf bean primary leaves and with the total Cd contents. In contrast to Zn, the Cd content in plant leaves was well-correlated with the total soil Cd concentration. Our results are in agreement with those of Meers et al. (2007b), who found that Rhizon Cd-extraction was well-correlated with the Cd contents in *P.vulgaris* considering it provided the best measure of Cd phytoavailability in the soil. Duquene et al., (2010) found a good correlation between the DGT-measured uranium concentrations with that in the soil solution. Perez and Anderson (2009) also found that C_{DGT} correlated well with the Cd concentration in soil pore water.

Conversely, many authors observed a significant correlation between C_{DGT} and the plant uptake of PTE (Zhang et al., 2001; Nowack et al., 2004). Almas et al., (2006) also found a correlation between C_{DGT} and the ryegrass uptake of Zn, but such a correlation was not found for Cd, whereas no linear relationship between the effective concentrations (CE) measured by DGT and the metal contents in spinach was found.

Despite the differences in the soil sample properties, a similar pattern to Zn was observed for Pb in both the MDN and LPF samples. Again, a significant positive correlation was observed between each of the Pb concentration in soil pore water, Pb concentration as measured by DGT, and Pb content in the plant primary leaves with the total Pb content for MDN and LPF samples. The Pb content in plant leaves was well-correlated with the total soil Pb concentration for the MDN and LPF samples.

The Pb_{DGT} concentration also exhibited positive linear correlations with the Pb content in plant primary leaves and the total soil Pb content for the MDN and LPF samples. The As and Sb SPW concentrations collected at the end of the period of plant growth showed positive correlations with their concentrations measured by DGT and their concentrations in plant leaves, whilst, they exhibited a negative correlation with their total soil concentrations.

Conversely, As and Sb concentrations measured by DGT showed a positive correlation with those found in dwarf bean leaves, whilst they showed a significant negative correlation with their total soil concentrations. As and Sb concentrations in plant leaves also showed a significant negative correlation with their total soil contents. Relationships between the Sb concentrations in plants and the total soil are based on numerous data from the literature. Tschan et al., (2009b) showed a relationship between the soluble Sb concentration in soil and the Sb concentration in plants.

Previous studies of soils from abandoned mining areas have shown that As and Sb tend to be present in the soil and sediments at low solubility levels (Flynn et al., 2003; Gal et al.,

2007) associated with organic matter or the residual phase (Tighe et al., 2005; Nóvoa-Muñoz et al., 2007), indicating that As and Sb are geochemically immobile (Diemar et al., 2009). Their low phytoavailabilities and uptakes into biological systems are the result of the presence of relatively insoluble species or low contents of mobile fractions, resulting in low accumulations of these metals in food chains (Hammel et al., 2000; Flynn et al., 2003).

More generally plant roots play an important role in the transformation of PTE in soils (Koo et al., 2005) via its exudates including organic acids as well as several forms of carbohydrates which could affect the mechanisms of the transformation of chemical form of PTE, biosorption and the modification of the soil environment in the rhizosphere. At the rhizosphere which includes the interface between plant roots and soil system, the behaviour of PTE in the soil solution should be demonstrated to better understand their soil-to-plant transfer. The concentration of PTE in the rhizosphere soil solution is often considered to reflect accurately the plant-available concentration of PTE in the soil, which is influenced by properties as the dissolved organic carbon (DOC) and pH (Sauvé et al. 1997; Vijver et al. 2003).

Three mechanisms can be in fact influenced by plant roots: modification of the soil environment in the rhizosphere, transformation of chemical form of PTE, and biosorption. Plants developing on a PTE contaminated soil will respond differently depending on their biomass, root exploration volume and PTE accumulation capability.

Table 3.3.5: Pearson's correlation coefficients between potentially toxic element indices: (total dissolved concentration of metal in the soil pore water (C_{spw}), DGT measured concentration (C_{DGT}), concentration of metal in plant leaves ($C_{plant, DW}^a$), metal mineral mass (Mm) and soil total metal concentration (C_{tot}) in the MDN and LPF samples.

Element		C_{spw}	C_{DGT}	C_{plant}	C_{tot}	Mm
MDN						
Zn	C_{spw}	1				
	C_{DGT}	0.99***	1			
	C_{plant}	0.65*	0.70*	1		
	C_{tot}	Ns	Ns	0.99***	1	
	Mm	0.70*	0.73*	0.98***	0.98***	1
Pb	C_{spw}	1				
	C_{DGT}	0.62*	1			
	C_{plant}	0.93***	0.76**	1		
	C_{tot}	0.86**	0.62*	0.73**	1	
	Mm	0.61*	0.66**	0.89***	0.82**	1
Cd	C_{spw}	1				
	C_{DGT}	0.59*	1			
	C_{plant}	0.83**	0.86**	1		
	C_{tot}	0.61*	0.57*	Ns	1	
	Mm	0.54*	0.82**	0.81**	Ns	1
LPF						
As	C_{spw}	1				
	C_{DGT}	0.99***	1			
	C_{plant}	0.91***	0.92***	1		
	C_{tot}	- 0.99***	- 0.98***	- 0.91***	1	
	Mm	0.83**	0.85**	0.92***	- 0.80**	1
Pb	C_{spw}	1				
	C_{DGT}	0.92***	1			
	C_{plant}	0.82**	0.73*	1		
	C_{tot}	0.87**	0.92***	0.89**	1	
	Mm	Ns	Ns	Ns	Ns	1
Sb	C_{spw}	1				
	C_{DGT}	0.56*	1			
	C_{plant}	0.73*	0.69*	1		
	C_{tot}	- 0.67*	- 0.56*	- 0.68*	1	
	Mm	Ns	Ns	Ns	Ns	1

- ^aDW: dry weight, Ns: not significant.

- Correlation is significant at the *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ level.

4. Conclusions

The article provides new information on PTE speciation and mobility in contaminated soils presenting a multi-metallic contamination from a former mining and smelting site. This study aimed to assess the ability of both the diffusive gradients in thin films (DGT) and Rhizon soil moisture sampler methods to predict the bioavailabilities of PTE in two contaminated technosols contaminated with Zn, Cd, Pb, As and Sb.

In contrast to classical single extraction methods that did provide poor correlation for As and Sb, for all of the studied PTE, we found a significant correlation between the DGT-measured concentrations and the PTE concentrations in the SPW. Good correlations were also found between both the PTE in SPW and as measured by DGT (C_{DGT}) with the PTE accumulation in dwarf bean primary leaves. The most general conclusion is that the two methods used to measure the PTE concentrations in this study of contaminated technosols result in significant correlations between the PTE pools assessed.

The chemical assessment of bioavailabilities using Rhizon soil moisture samplers and DGT methods may thus provide the information required to predict PTE bioavailabilities. Zn, Pb and Cd were readily mobile elements and potentially phytoavailable in the technosols from the smelting site whereas Pb, Sb and As were much less available in the mining site.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Baghdad, Iraq) for the financial support, Dr. Domenico Morabito (LBLGC, Université d'Orléans, France) for microwave digestion, Mrs Audrey Dufour (Cetrahe, University of Orléans, France) for the analysis of major cations and anions, and Dr. Cécile Grosbois (Gehco, Université de Tours, France) for granulometric analysis.

References

- Adriano, D.C., (1986) Trace elements in the terrestrial environment. Springer-Verlag, New York.
- Adriano, D.C., (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risk of Metals. Springer-Verlag, New York, pp. 866.
- Afnor (1999) Recueil de Normes Françaises. Qualité des sols, Afnor Paris.

- Almas, A.R., Lombnas, P., Sogn, T.A., Mulder, J., (2006) Speciation of Cd and Zn in contaminated soils assessed by DGT-DIFS, and WHAM/Model VI in relation to uptake of spinach and ryegrass. *Chemosphere* 62, 1647–1655.
- Bargagli, R., (1998) Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer-Verlag, Berlin, pp.324
- Beesley, L., Moreno-Jimenez, E., Clemente, R., Lepp, N., Dickinson, N., (2010a) Mobility of arsenic, cadmium and zinc in a multi-element contaminated soil profile assessed by in-situ soil pore water sampling, column leaching and sequential extraction. *Environ. Pollut.* 158, 155-160.
- Bleeker, P.M., Teiga, P.M., Santos, M.H., De Koe, T., Verkleij, J.A.C., (2003) Ameliorating effects of industrial sugar residue on the Jales gold mine spoil (NE Portugal) using *Holcus lanatus* and *Phaseolus vulgaris* as indicators. *Environ. Pollut.* 125, 237–244.
- Carrillo- Gonzalez R, Simunek J, Sauvé S, Adriano D (2006) Mechanisms and Pathways of Trace Element Mobility in Soils. *Advances in Agronomy*, Volume 91, pp. 111-178
- Casado, M., Anawar, H.M., Garcia-Sanchez, A., Santa Regina, I., (2007) Antimony and arsenic uptake by plants in an abandoned mining area. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 38, 1255–75.
- Chapman, P.M., Wang, F., Germano, J.D., Batley, G., (2002) Pore water testing and analysis: the good, the bad, and the ugly. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 359–366.
- Clemente, R., Dickinson, N.M., Lepp, N.W., (2008) Mobility of metals and metalloids in a multi-element contaminated soil 20 years after cessation of the pollution source activity. *Environ. Pollut.* 155, 254–261.
- Datta, S.P., Young, S.D., 2005. Predicting metal uptake and risk to the human food chain from leaf vegetables grown on soils amended by long-term application of sewage sludge. *Water Air Soil Pollut.* 163, 119-136.
- Davison, W., Fones, G., Harper, M., Teasdale, P., Zhang, H., (2000) Dialysis, DET and DGT: in situ diffusional techniques for studying water, sediments and soils, In *Situ Monitoring of Aquatic Systems – chemical analysis and speciation*, Buffle, J. and Horvai, G (Eds.), IUPAC, Wiley, Chichester, 495-569.
- Davison, W., Zhang, H., (1994) In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367, 546-548.

- Degryse, F., Smolders, E., Oliver, I., Zhang, H., (2003) Relating soil solution Zn concentration to diffusive gradients in thin films measurements in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3958–3965.
- Denys, S., Tack, K., Caboche, J., Delalain, P., (2008) Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. *Chemosphere* 74, 711–6.
- Diemar, G.A., Filella, M., Leverett, P., Williams, P.A., (2009) Dispersion of antimony from oxidizing ore deposits. *Pure Appl. Chem.* 81, 1547-1553.
- Duquene, L., Vandenhove, H., Tack, F., Van Hees, M., Wannijn, J., (2010) Diffusive gradient in thin FILMS (DGT) compared with soil solution and labile uranium fraction for predicting uranium bioavailability to ryegrass. *J. Environ. Radioactiv.* 101, 140–147.
- Ernstberger, H., Zhang, H., Tye, A., Young, S., Davison, W., (2005) Desorption Kinetics of Cd, Zn, and Ni Measured in Soils by DGT. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1591-1597.
- Ernstberger, H., Davison, W., Zhang, H., Tye, A., Young, S., (2002) Measurement and dynamic modelling of trace metal mobilization in soils using DGT and DIFS. *Environ. Sci. Technol.* 36, 349–54.
- Fitz, W.J., Wenzel, W.W., Zhang, H., Nurmi, J., Kamil, S., Ficherova, Z., Schweiger, P., Köllensperger, G., Ma, L.Q., Stingeder, G., (2003) Rhizosphere characteristics of the arsenic hyper accumulator *Pteris Vittala* L. and monitoring of phytoremoval efficiency. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5008-14.
- Flynn, H.C., Meharg, A.A., Bowyer, P.K., Paton, G.I., (2003) Antimony bioavailability in mine soils. *Environ. Pollut.* 124, 93 – 100.
- Gal, J., Hursthouse, A., Cuthbert, S., (2007) Bioavailability of arsenic and antimony in soils from an abandoned mining area, Glendinning (SW Scotland). *J. Environ. Sci. Health A.* 42, 1263–74.
- Gorsuch, J.W., Lower, W.R., Lewis, M.A., Wang, W., (1991) *Plants for Toxicity Assessment*, ASTM STP 1115. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Hammel, W., Debus, R., Steubing, L., 2000. Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere* 41, 1791-1798.
- Hooda, P.S., Zhang, H., Davison, W., Edwards, C., (1999) Measuring bioavailable trace metals by diffusive gradients in thin films (DGT): soil moisture effects on its performance in soils. *Eur. J. Soil. Sci.* 50, 285–294.

- Impellitteri CA, Allen HE, Yin Y et al. 2001. Soil properties controlling metal partitioning. In: Heavy Metal Release in Soils, eds. H.M. Selim, D.L. Sparks, 149–165. Lewis Publ., Boca Raton, FL.
- ISO 10390 (2005) Soil quality – Determination of pH. International Organization for Standardization, Geneva
- ISO 1999 Soil Quality. Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials Guidelines no ISO TC 190/SC 7 ISO/DIS 15799. ISO Geneva Switzerland
- Kabata-Pendias A (2010) Trace elements in soils and plants. 4th ed. CRC, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL.
- Knight BP, Chaudri AM, McGrath SP, Giller KE (1998) Determination of chemical availability of cadmium and zinc in soils using inert soil moisture samplers. Environ Pollut 99: 293-298
- Koo BJ, Adriano DC, Bolan NS, and Barton C (2005) Plant root exudates. In: Encyclopedia of Soils in the Environment, (D. Hillel, Ed.). Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Koster, M., Reijnders, L., van Oost, N.R., Peijnenburg, W.J., (2005) Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods. Environ. Pollut. 133, 103–16.
- Levresse, G., Lopez, G., Tritlla, J., Lopez, E.C., Chavez, A.C., Salvador, E.M., Soler, A., Corbella, M., Sandoval, L.G.H., Corona-Esquivel, R., (2012) Phytoavailability of antimony and heavy metals in arid regions: The case of the Wadley Sb district (San Luis, Potosí, Mexico). Sci. Total. Environ. 427, 115-125.
- Li, X., Thornton, I., (1993) Arsenic, antimony and bismuth in soils and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England. Environ. Geochem. Health 15, 135–44.
- Meers, E., Samsonb, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegheuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., (2007b) Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. Environ. Exp. Bot. 60, 385–396.
- Mojsilovic, O., McLaren, R., Condon, L.M., (2011) Modelling arsenic toxicity in wheat: Simultaneous application of diffusive gradients in thin films to arsenic and phosphorus in soil. Environ. Pollut. 159, 2996–3002.
- Moreno-Jimenez, E., Six, L., Williams, P.N., Smolders, E., (2013) Inorganic species of arsenic in soil solution determined by microcartridges and ferrihydrite-based diffusive gradient in thin films (DGT). Talanta 104, 83–89.

- Muhammad, I., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., (2012) Cadmium and Zn availability as affected by pH manipulation and its assessment by soil extraction, DGT and indicator plants. *Sci. Total. Environ.* 416, 490–500.
- Néel, C., Bril, H., Courtin-Nomade, A., Dutreuil, J.P., (2003) Factors affecting natural development of soil on 35-year-old sulphide-rich mine tailings. *Geoderma* 111, 1 – 20.
- Nia, Y., Garnier, J.M., Rigaud, S., Hanna, K., Ciffroya, P., (2011) Mobility of Cd and Cu in formulated sediments coated with iron hydroxides and/or humic acids: A DGT and DGT-PROFS modeling approach. *Chemosphere* 85, 1496 – 504.
- Nolan, A.L., McLaughlin, M.J., Mason, S.D., (2003) Chemical speciation of Zn, Cd, Cu, and Pb in pore waters of agricultural and contaminated soils using Donnan dialysis. *Environ. Sci. Technol.* 37, 90 – 98.
- Nóvoa-Muñoz, J.C., Queijeiro, J.M., Blanco-Ward, D., Alvarez-Olleros, C., García-Rodeja, E., Martínez-Cortizas, A., (2007) Arsenic fractionation in agricultural acid soils from NW Spain using a sequential extraction procedure. *Sci. Total. Environ.* 378, 18 – 22.
- Nowack, B., Koehler, S., Schulin, R., (2004) Use of diffusive gradients in thin films (DGT) in undisturbed field soils. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1133–1138.
- Osterlund, H., Chlot, S., Faarinen, M., Widerlund, A., Rodushkin, I., Ingri, J., Baxter, D.C., (2010) Simultaneous measurements of As, Mo, Sb, V and W using a ferrihydrite diffusive gradients in thin films (DGT) device. *Anal. Chim. Acta.* 682, 59 – 65.
- Peijnenburg, W., Postuma, L., Eijsackers, H., Allen, H., (1997) A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37, 163–172.
- Pérez, A.L., Anderson, K.A., (2009) DGT estimates cadmium accumulation in wheat and potato from phosphate fertilizer applications. *Sci. Total Environ.* 407, 5096–5103.
- Plaza, G.A., Nalecz-Jawecki, G., Pinyakong, O., Illmer, P., Margesin, R., (2010) Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal and hydrocarbon-contaminated sites, *Environ. Monit. Assess.* 163, 477–488.
- Pueyo, M., López-Sánchez, J.F., Rauret, G., (2004) Assessment of CaCl₂, NaNO₃ and NH₄NO₃ extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Anal. Chim. Acta.* 504, 217–226
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA, Hendershot WH (1997) Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air Soil Pollut* 100: 133–149

- Seguin, V., Gagnon, C., Courchesne, F., (2004) Changes in water extractable metals, pH and organic carbon concentrations at the soil-root interface of forested soils. *Plant Soil* 260, 1–17.
- Song, J., Zhao, F.J., Luo, Y.M., McGrath, S.P., Zhang, H., (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ. Pollut.* 128, 307–315.
- Thiry, M., van Oort, F., (1999) Les phases minérales majeures et mineures d'une friche industrielle de métallurgie des métaux non ferreux: état d'altération, évolution géochimique et devenir des métaux polluants du site de Mortagne-du-Nord, In: Les cahiers des clubs CRIN, acte du colloque 'La Spéciation des Métaux dans le Sol. Association ECRIN Paris 108–159 pp.
- Tiensing, T., Preston, S., Strachan, N., Paton, G.I., (2001) Soil solution extraction techniques for microbial ecotoxicity testing: a comparative evaluation. *J. Environ. Monit.* 3, 91-96.
- Tighe, M., Lock wood, P., Wilson, S., (2005) Adsorption of antimony (V) by flood- plain soils, amorphous iron (III) hydroxide and humic acid. *J. Environ. Monit.* 7, 1177–85.
- Tschan, M., Robinson, B.H., Schulin, R., (2009b) Antimony in the soil-plant system - a review. *Environ. Chem.* 6, 106 – 115.
- Vandenhove, H., Antunes, K., Wannjin, J., Duquène, L., Van Hees, M., (2007) Method of diffusive gradients in thin films (DGT) compared with other soil testing methods to predict uranium phytoavailability. *Sci. Total Environ.* 373, 542-555.
- Vijver M, Jager T, Posthuma L, Peijnenburg W (2003) Metal uptake from soils and soil-sediment mixtures by larvae of *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera). *Ecotoxicol Environ Saf* 54: 277–289
- Vangronsveld, J., Clijsters, H., (1992) A biological test system for the evaluation of metal phytotoxicity and immobilization by additives in metal-contaminated soils. In: Merian, E., Haerdi, W. (Eds.), *Metal Compounds in Environment and Life*, 4 (Interrelation Between Chemistry and Biology). Science and Technology Letters, Northwood, 117–125 pp.
- Wanat, N., Austruy, A., Joussein, E., Soubrand, M., Hitmi, A., Gauthier-Moussard, C., Lenain, J.F., Vernay, P., Munch, J.C., Pichon, M., (2013) Potentials of *Miscanthus×giganteus* grown on highly contaminated Technosols. *J. Geochem. Explor.* 126, 78–84.

- Wanat, N., Joussein, E., Soubrand, M., Lenain, J.F., (2014) Arsenic (As), antimony (Sb), and lead (Pb) availability from Au-mine Technosols: a case study of transfer to natural vegetation cover in temperate climates. *Environ. Geochem. Hlth.* DOI 10.1007/s10653-014-9596-5.
- Wang, J., Zhang, C.B., Jin, Z.X., (2009) The distribution and phytoavailability of heavy metal fractions in rhizosphere soils of *Paulownia fortunei* (seem) Hems near a Pb/Zn smelter in Guangdong China. *Geoderma* 148, 299–306.
- Zhang, H., Davison, B., (1995) Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 67, 3391–400.
- Zhang, H., Davison, W., Gadi, R., Kobayashi, T., (1998) In situ measurement of dissolved phosphorus in natural waters using DGT. *Anal. Chim. Acta.* 67, 29-38.
- Zhang, H., Lombi, E., Smolders, E., Mc Grath, S., (2004) Kinetics of Zn Release in Soils and Prediction of Zn Concentration in Plants Using Diffusive Gradients in Thin Films. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3608-3613.
- Zhang, H., Zhao, F., Sun, B., Davison, W., McGrath, S.P., (2001) A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2602–2607.

Chapitre 4

Effets rhizosphériques sur la mobilité des éléments traces métalliques

Dans cette dernière partie, nous présentons l'effet de composés naturels (Exsudats racinaires) de *Populus euramericana* Dorskamp et chimiques (ajouts d'azote sous forme de nitrate ou d'ammonium) sur la mobilité et phytostabilité des EPT (Zn, Cd et Pb) dans les sols du site de Mortagne-du-Nord (MDN) en utilisant un système de type rhizobox au laboratoire

Nos résultats sont présentés sous forme d'articles (accepté et en révision mineur). Les chapitres **4.1 et 4.2** présentent les résultats obtenus sur l'effet rhizosphérique et l'effet temporel de l'addition d'azote respectivement sur la mobilité des métaux étudiés.

Ce chapitre est subdivisé en deux sous-chapitres :

Chapitre 4.1 : Effets rhizosphériques de *Populus euramericana* Dorskamp sur la mobilité du Zn, Pb et Cd dans les technosols contaminés.

Chapitre 4.2 : Effet de la fertilisation en azote (sous forme de nitrate ou d'ammonium) sur la phytostabilisation du Zn, Pb et Cd par *Populus euramericana* Dorskamp dans les technosols contaminés.

Chapitre 4.1

Effets rhizosphériques de *Populus euramericana* Dorskamp sur la mobilité du Zn, Pb et Cd dans les technosols contaminés

Résumé de l'article 4

La rhizosphère, se distingue d'un horizon de sol quelconque par la présence des racines des plantes qui sont capables d'influencer le transfert sol-plante des métaux et métalloïdes. En effet, il a été démontré que les paramètres de la rhizosphère (modifications physiques, chimiques et biologiques et celles induites par le système racinaire) sont potentiellement différents de ceux du sol total (Hinsinger, 1998; 2001). Les changements de pH et de l'activité microbienne qui est induit par les racines et la liaison subséquente des métaux et métalloïdes par les exsudats racinaires sont considérés comme les facteurs les plus importants en termes de différence entre la rhizosphère et le sol total.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet rhizosphérique de *Populus euramericana* Dorskamp sur la mobilité de Zn, Cd et Pb après deux mois de culture dans des technosols contaminés en utilisant un système de rhizobox en laboratoire.

Pour réaliser l'objectif de ce travail, 3 échantillons de sols de surface (0 – 20 cm) du site de Mortagne-du Nord (nommés MDN1, MDN2, MDN3) ont été collectés à des profondeurs de 0 à 20 cm, séchés à l'air et tamisés à 2mm avant d'être placés en rhizobox au laboratoire. L'effet rhizosphérique sur le pH, les concentrations de carbone organique dissoute (COD) et les concentrations des EPT dans la solution du sol a été caractérisé pendant la croissance de *Populus euramericana* Dorskamp pendant 60 jours. Nous avons également mesuré les concentrations des EPT accumulés dans les organes (tiges, feuilles, racines) des plants de peupliers en fin d'expérimentation. Toutes les analyses élémentaires sur l'eau interstitielle et les concentrations des ETP dans les organes des plants ont été obtenues par ICP-MS.

Nos résultats ont montré que, pour tous les sols étudiés, le pH de l'eau interstitielle rhizosphérique a augmenté de 0.3 à 0.6 unités par rapport aux sols totaux lors de la croissance des plants de peupliers. De même les concentrations de COD ont également augmenté indépendamment du type de sol ou des concentrations totales de métaux par rapport aux sols totaux. Les concentrations des EPT dans l'eau interstitielle de la rhizosphère ont diminué de façon significative après la croissance des plantes pour tous les sols étudiés par rapport aux sols totaux. Le transfert limité des EPT vers les parties aériennes des plants confirme le rôle potentiel du peuplier dans l'immobilisation des métaux.

Finalement, nous pouvons dire que *Populus euramericana* Dorskamp est un bon candidat pour la phytostabilisation des EPT dans des technosols contaminés.

Article 4: Accepted in
(*J. Soils and Sediments*)

Rhizospheric effects of *Populus euramericana* Dorskamp on the mobility of Zn, Pb and Cd in contaminated technosols

Bashar Qasim^{1,2,*}, Mikael Motelica-Heino¹, Sylvain Bourgerie³, Arnaud Gauthier⁴, Domenico Morabito³

¹Institut des Sciences de la Terre d'Orléans (ISTO), UMR-CNRS 7327 Campus Géosciences, Université d'Orléans, France.

²Applied Sciences Department, University of Technology, Baghdad, Iraq.

³LBLGC EA 1207, INRA USC1328, Université d'Orléans, France.

⁴Laboratoire de Génie-Civil et géoEnvironnement (LGCgE), Université de Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, Lille, France.

Abstract

This study aimed at investigating the rhizospheric effects of *Populus euramericana* Dorskamp on the mobility of Zn, Pb and Cd in contaminated technosols from a former smelting site. A rhizobox experiment was conducted with poplars, where the plant stem cuttings were grown in contaminated technosols for two months under glasshouse conditions. After plant growth, rhizospheric and bulk soil pore water (SPW) were sampled together. SPW properties such as pH, dissolved organic carbon (DOC) and total dissolved concentrations Zn, Pb and Cd were determined. The concentrations of Zn, Pb and Cd in plant organs were also determined. Rhizospheric SPW pH increased for all studied soils by 0.3 to 0.6 units compared to bulk soils. A significant increasing was also observed for DOC concentrations regardless the soil type or total metal concentrations, which might be attributed to the plant roots activity. For all studied soils, the rhizospheric SPW metals concentrations decreased

significantly after plant growth compared to bulk soils which might be attributed to the increase in pH and effects of root exudates. Zn, Pb and Cd accumulated in plant organs and the higher metals concentrations were found in plant roots compared to plant shoots. The restricted transfer of the studied metals to the plant shoots confirms the potential role of this species in the immobilisation of these metals. Thus *Populus euramericana* Dorskamp can be used for phytostabilisation of technosols.

Keywords: Contaminated soil, *Populus euramericana* Dorskamp, Rhizosphere, Rhizobox experiment, Smelting site, Soil pore water.

1. Introduction

Metals and metalloids occur naturally at low concentrations in soils. Due to its potential ecotoxicological effects, soil contamination by these potentially toxic elements (PTE) has become a critical environmental concern. Mining and smelting of metal ores activities have increased the spread and occurrence of PTE contamination by release of a huge amount of PTE into the environment through wind and water runoff erosion (Razo et al. 2004; Navarro et al. 2008). In the literature, several studies have been conducted to assess and remediate contaminated sites. Some of these preliminary studies are based on monometallic strains and poplar trees (reconstituted soils spiked with monometallic solution) (Durand et al. 2010; 2011).

Phytoremediation is a developing technology that uses green plants to clean up contaminated soil by translocation of PTE from soils to plants or immobilization of PTE in the plants rhizosphere and has recently emerged as a perceived green alternative to expensive and ecologically instructive conventional remediation technologies (Reeves et al. 2000; Lim et al. 2004). It has the advantages of being environmentally friendly and less disruptive to the soil (Salt et al. 1995). The understanding of the factors that control plant accumulation or contribute to immobilization of metal contaminants is one of the basic principles of phytoremediation.

It is well reported that the rhizosphere is a dynamic region where multiple interactions occur in the plant roots-soil-microbe system (Darrah et al. 2006). Moreover it has been assumed that the rhizosphere parameters (i.e. chemical, physical and biological root-modifications) were entirely different from that of bulk soil parameters (Curl and Truelove 1986). The factors influencing metal(loid)s mobility and bioavailability include root-induced

pH changes, root-induced microbial activity and metal binding by root exudates that are considered as the most important factors of differences between rhizosphere and bulk soil (Ernst 1996). Therefore, the dynamic, transformations, bioavailability and toxicity of PTE in the rhizosphere are expected to differ noticeably from those in bulk soil.

The soil solution is the medium through which the PTE exert their effects on organisms (Knight et al. 1998). At the rhizosphere which includes the interface between plant roots - soil system, the behavior of PTE in the soil solution should be demonstrated to better understand their soil to plant transfer. The concentration of PTE in the rhizosphere soil pore water (SPW) is often considered to reflect accurately the plant-available concentration of PTE in the soil, which is influenced by properties as the dissolved organic carbon (DOC) and pH (Sauvé et al. 1996; Vijver et al. 2003). It is well reported that the nature of the metal species and metal speciation in soil SPW is an important factors which dictate the plant metal uptake (Kim et al. 2010b).

Root activity (e.g. excretion of H^+ and HCO_3^- , respiration uptake of water and nutrients and exudation of organic compounds) can alter the chemical conditions in the rhizosphere SPW (Hinsinger 1998, 2001). Due to its solubility and lability, DOC plays also a key role in sustaining soil microbial activity (Kalbitz et al. 2000; Chantigny 2003). Therefore, the analysis of the rhizosphere SPW during the cultivation period may provide useful information concerning the potential toxicity of the PTE (Lorenz et al. 1994; Yanai et al. 1995, 1998; Moritsuka et al. 2000b). In fact soil pH, soil organic matter (SOM), DOC and the presence of organic acids (OAs) significantly influence metal solubility (Sauvé et al. 1997; Hees et al. 2000; Weng et al. 2002) and may be considerably different from that in the bulk soil. In particular, DOC compounds present in root exudates such as carboxylic acids contribute in the formation of soluble metal chelate complexes with P and changing soil pH resulting in the mobilisation of inorganic P in the rhizosphere (Kirk et al. 1999).

The aim of this study was to investigate the early responses of Zn, Cd and Pb mobility to rhizosphere effect of *Populus euramericana* Dorskamp in contaminated technosols after two months of cultivation of woody plant stem cuttings using a rhizobox system. This duration time is important (Di Baccio et al. 2014) according to the fact that poplar trees are mainly propagated by cutting rooting. Moreover this genotype has demonstrated an important metal accumulation (Pottier et al. 2015) and to grow on contrasting sites (Bonhomme et al. 2008). Total dissolved concentrations of PTE in SPW were determined together with control factors such as pH and DOC concentration in comparison with bulk soil. Additionally, the

concentrations of these metals in plant organs were determined to investigate the translocation or immobilization capability of *Populus euramericana* Dorskamp.

2. Materials and method

2.1. Soil sampling

Soil samples used in this study were collected from a metalicolous grassland contaminated with Zn, Pb and Cd located at Mortagne-du-Nord (MDN) in Northern France. This area is adjacent to a former metallurgical site occupied for over 60 years by a Zn smelter unit linked to a sulfuric acid production unit and a Pb smelting unit (Thiry and van Oort 1999). The geological context is made of the Sand of Ostricourt (Paleocene/ lower Eocene). These are glauconious sands with a medium granulometry. On top of them is the clay alluvial material of the nearby River Scarpe, clays and fine sands rich in organic matter. Three soil sampling sites named (MDN1, MDN2, and MDN3) were selected for this study according to the level of PTE concentrations (Qasim and Motelica-Heino 2014; Qasim et al. 2015) and spatial distribution of the vegetation which essentially consists of *Arabidopses hallari* L. and *Avena sativa* L.

Surface soils (0-20cm) were sampled from each location with a stainless steel spade, carefully transferred to clean polyethylene bags before transport to the laboratory, oven-dried for 72h at a constant temperature of 40°C, manually homogenized, then sieved using a 2mm mesh sieve to remove the gross matter.

2.2. Soil physico-chemical properties

Soil physico-chemical properties were characterized by routine soil testing laboratories according to standardized French (AFNOR 1999) or international (ISO 1999) procedures. Soil pH and EC were determined in deionised water extracts (1:2.5 w/v) (NF ISO 10390 (2005)), using a combined pH-EC meter (WTW, ProfiLine 1970i, Germany), calibrated using pH 4.0 and pH 7.0 standards. Total organic carbon was determined according to ISO (1999). Cation exchange capacity (CEC) was determined by the 0.05N cobalthexamine method (Aran et al. 2008). Total metals concentration were determined by aqua regia/hydrofluoric acid digestion (Zhang et al. 2008), then measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Finnigan Element XR, Thermo Electron, Germany).

2.3. Reagents and standards

All the reagents used to prepare the extracting solutions were products of analytical-grade quality (Merck pro-analysis, Darmstadt, Germany). All solutions and dilutions were prepared using ultra-pure water ($18.2\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$) (Thermo Scientific Barnstead Easy pure II systems). Standard stock solutions of 1000 mg l^{-1} of different elements were prepared from metal wires or salts of purity higher than 99.998% (VWR international, BDH Prolabo ICP Standards, Belgium). Diluted standard working solutions were prepared from these on a daily basis. All laboratory glassware and plastic ware were rinsed three times with double deionized water after being soaked in a HNO_3 (10%, v/v) batch for 24h.

2.2. Rhizobox and cultivation experiment

A rhizobox experiment was conducted in a greenhouse for two months. In this work, a rectangular rhizobox with dimensions of $150 \times 180 \times 260$ (length $\times$ width $\times$ height, in mm) were used. It was divided into three sections: a root compartment (60 mm in width), and left and right non-rhizosphere zones (100 mm in width). Root growth was limited to the central compartment within the nylon cloth 300 mesh (DIATEX sas, France). 1 kg of soil was placed in the rhizosphere zone. In each of the 2 non-rhizosphere zones 1.75 kg were placed.

Populus euramericana Dorskamp plant was cultivated in the rhizosphere zone and the experiment was made in three replicates. The plants were watered by distilled water throughout the study to keep the soil at approximately 80% of its water holding capacity. The plants were allowed to grow for 2 months in a greenhouse under controlled conditions with natural light and air temperature of 22°C and 55% relative air humidity.

At the end of the experiment, the plants were harvested, washed thoroughly with tap water and then rinsed with distilled water. Each plant was separated into roots, stems, cuttings and leaves. Then the plant organs were oven dried in 70°C for 3days. Dried plant organs were ground with a laboratory grinder and 200mg ($\pm 0.5\text{mg}$) of each plant organs were digested with a pressurized closed-vessel microwave system (Multiwave 3000, Anton Paar GmbH, Germany). Microwave polyfluoroacetylene (PFA)-teflon vessels were cleaned before each digestion using 10ml of aqua regia (HNO_3/HCl , 1:3v/v, Fisher scientific, UK), heated for 20min. at 200°C and then rinsed with double deionized water. Blanks were processed in a method identical to the samples. ICP–MS measurements were carried out by diluting 1:10

with Milli-Q water the plant digests to determine the studied PTE concentrations in plant organs.

2.3. Soil pore water collection and analysis

Soil pore water (SPW) was collected at the beginning and at the end of the experiment by Rhizon soil moisture samplers (Rhizosphere Research Products, Wageningen, The Netherlands). Water was priorly added to the soil to obtain 80% of the WHC and the soil was allowed to equilibrate for 24hr. The SPW were separated into several sub-samples and stored at 4°C until the analysis step.

An aliquot (3ml) of each SPW was acidified with nitric acid and ICP-MS measurement used to determine the PTE (Zn, Pb and Cd) concentrations in SPW. The rest of the SPW solutions were used to measure pH using a combination pH-EC meter and DOC concentration using an automatic carbon analyzer (Shimadzu© TOC 5000A).

2.4. Statistical analysis

Results were analyzed with the SPSS statistical software package (SPSS, Chicago, IL, USA). Means are expressed with their standard error ($\pm$ SE). Statistical comparison of the means resulted from Student's *t*-test. Levels of significance were $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$. For dry weight and PTE concentrations in plant organs means are expressed with their standard error and were compared by ANOVA. In each case the number of replicates (*n*) is indicated. Statistical tests were considered significant at $P \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Studied soil properties

The main physico-chemical properties of the soil samples are summarized in Table 4.1.1. Soil samples were different in their main physical and chemical properties. Soils pH was acidic to slightly acid and ranged from 6.1 to 6.9. Total organic carbon (TOC) ranged from 3.3 to 6.45%. Cation exchange capacity varied from 6.7 to 8.5 cmol(+)kg⁻¹ for MDN1, MDN2 and MDN3 respectively. The total PTE were also varied among the studied soils. The highest PTE concentration was observed for MDN1. The PTE concentration in both MDN2 and MDN3 was almost similar but it remains less than that for MDN1. Among the studied metals, Zn has the highest concentration in all studied soils.

Table 4.1.1: Physico-chemical characteristics of the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) (n=3; $\pm$ standard deviation).

Parameters	MDN1	MDN2	MDN3
pH-H ₂ O	6.92 $\pm$ 0.12	6.35 $\pm$ 0.34	6.14 $\pm$ 0.17
EC (μ s.cm ⁻¹)	112.27 $\pm$ 3.85	112.64 $\pm$ 7.41	113.71 $\pm$ 1.93
CEC (c mol(+) kg ⁻¹)	7.21 $\pm$ 0.70	8.53 $\pm$ 0.25	6.74 $\pm$ 1.21
TOC %	3.35 $\pm$ 0.94	4.39 $\pm$ 0.14	6.45 $\pm$ 0.10
Clay %	0.95 $\pm$ 0.24	0.86 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.24
Silt %	22.34 $\pm$ 0.35	22.16 $\pm$ 0.41	22.13 $\pm$ 0.34
Sand %	75.45 $\pm$ 0.12	76.84 $\pm$ 1.03	76.66 $\pm$ 0.28
Tot. Zn (mg kg ⁻¹)	7726 $\pm$ 12	3114 $\pm$ 11	3127 $\pm$ 9
Tot. Pb (mg kg ⁻¹)	3551 $\pm$ 10	881 $\pm$ 8	874 $\pm$ 5
Tot. Cd (mg kg ⁻¹)	72 $\pm$ 11	64 $\pm$ 5	51 $\pm$ 6

EC: electrical conductivity, CEC: cation exchange capacity, TOC: total organic carbon

3.2. Soil pore water pH and DOC concentrations

The changes in the chemical soil properties occurred as a result of soil–plant interactions in the rhizosphere, and that the soil pH is one of the most important chemical factors controlling the metals availability (Fitz et al. 2003). At the end of the experiment, as can be seen in Fig. 4.1.1 a significant increase in SPW pH was observed after plant growth in all studied samples compared to bulk soil. The plant growth increased rhizosphere SPW pH by 0.3 to 0.6 units.

The release of H⁺ or OH⁻ by roots is the main process responsible for the pH changes in the rhizosphere resulted from imbalance uptake of anion and cation by plants roots (Haynes 1990; Sas et al. 2001; Bravin et al. 2009). Several studies have reported that plant growth reduced the rhizosphere soil pH resulting in acidification of the soils due to the release of H⁺ and organic acids by plants (Bernal and McGrath 1994; Gonzaga et al. 2009). The rhizosphere pH reduction might be also attributed to the build-up of CO₂ in the rhizosphere by the respiration process of microorganisms and roots (Hinsinger et al. 2005). Contrary to these findings, our results were however in agreement with Luo et al. (2000) who found that *T. caerulea* rhizosphere soil had a higher pH compared to the non-rhizosphere soils. Kim et

al. (2010a, b) also reported that soil solution pH increased by 1.3 units after Indian mustard and sunflower growth in both acidic and alkaline soils.

It appears in our experiment that independent of the characteristics of studied soils, the anion uptake by plant roots might increase of SPW pH of rhizosphere to maintain electrical neutrality across the root soil interface and to counterbalance the excess negative charge taken up by the roots (Nye, 1981; Gahoonia et al. 1992). This explains the results that the adjacent soil was more alkaline. Kim et al. (2010b) suggested that the increase of pH in acidic soils compared to alkaline soils might be attributed to the variable buffering capacity of these soils. In the other hand, Roemkens et al. (1999) suggested that changes of the calcium concentration resulted in increasing of rhizosphere SPW pH. However, increases in SPW pH in the rhizosphere can affect metals solubility at the root-soil interface.

Fig. 4.1.2 showed irrespective of soil type, a significant increase in DOC concentrations in the SPW of rhizosphere of all studied soils after plant growth. However, the DOC concentrations were almost more than 1.5 times higher compared with those of bulk soils. Our findings are in agreement with those of (Lorenz et al. 1997; Cattani et al. 2006; Khalid et al. 2007) who reported that the presence of a range of grassland plants significantly increased the DOC concentrations in comparison with unplanted soil. Similarly, Fitz et al. (2003) found that DOC concentrations were increased by 86% in rhizosphere soil solution of As hyperaccumulator *P. vittata*.

In fact, these authors have attributed the reason for DOC increase to root exudation and to the solubilisation or mineralisation of soil organic matter (SOM) which was caused by the microbial or rhizosphere activity. It is well known that the rhizodeposits such as root exudates serve as a carbon source; therefore, in this study, the increase in DOC concentrations after plant growth was attributed to the increasing release of root exudates (which consist of a complex mixture of organic acids, sugars, vitamins, nucleosides, inorganic ions).

Our data showed that the DOC concentration in MDN3, which is the less contaminated soil, were higher than that of MDN1, the most contaminated soil. This result is not in line with that of Wenzel et al. (2003) and Kim et al. (2010a) who reported that the highly contaminated soil releases more DOC than the less contaminated soils.

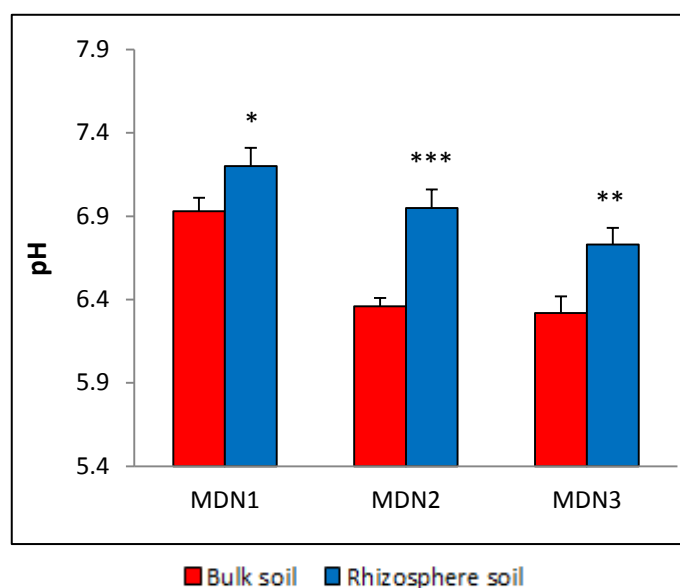


Figure 4.1.1: pH in the bulk soil solution and in the rhizospheric soil solution of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days. Bars represent standard errors (n = 3). Significantly different values by comparison with the bulk soil, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

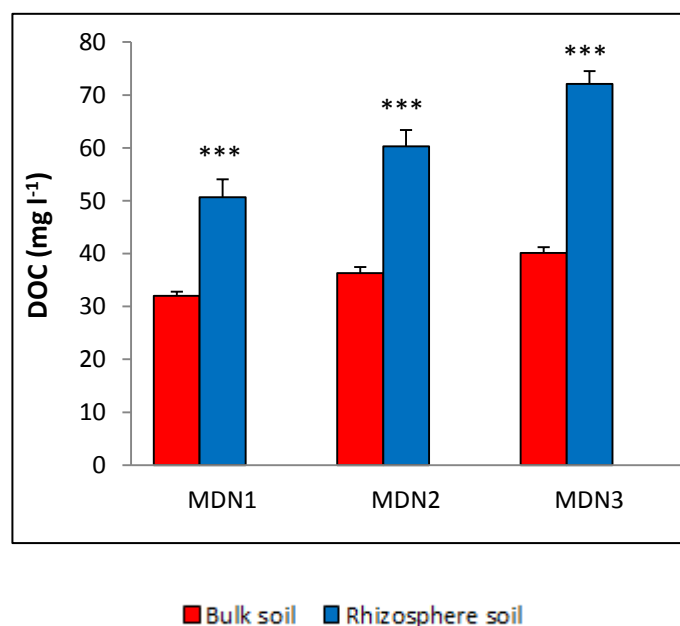


Figure 4.1.2: DOC concentrations in the bulk soil solution and in the rhizospheric soil solution of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days. Bars represent standard errors (n = 3). Significantly different values by comparison with the bulk soil, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3.3 Zn, Pb and Cd concentrations in rhizosphere soils

The total dissolved concentrations of Zn, Pb, and Cd in SPW at the end of the experiment are shown in Fig. 4.1.3. It can be seen that for all the studied soils, Zn

concentrations in rhizosphere SPW decreased significantly compared to the bulk soil. After plant growth, the solubility of Zn was reduced by 12.3% to 24.9% for the rhizosphere soils compared to bulk soil (Fig. 4.1.3A)

A similar picture was observed for Cd. The plant growth resulted in a significant decrease in rhizosphere SPW Cd concentrations relative to the bulk soil for MDN2 and MDN3 but not for MDN1. The solubility of Cd was reduced by 18.2% and 20% respectively (Fig. 4.1.3B).

A significant decrease in the rhizosphere SPW Pb concentrations was also observed in both MDN1 and MDN3 but not for MDN2. The solubility of Pb was reduced by 23% and 52% compared to bulk soil (Fig. 4.1.3C). For all studied soils, the Zn, Pb, and Cd concentrations in the SPW were significantly $P \leq 0.05$ decreased after plant growth compared to bulk soil indicating that the plant growth affected the studied PTE concentrations in SPW.

It is well known that root exudates influence metals behavior directly or indirectly, resulting in increase or decrease of their mobility and bioavailability by acidification, alkalisation, precipitation and their effects on physical and chemical properties of the rhizosphere (Tao et al. 2004; Uren and Reisenauer 1988). Additionally, several studies have reported that in contaminated soils, depending on the soil buffer capacity, the rhizosphere pH can increase up to 2 units compared to the bulk soil and may enhance metals bioavailability and increase metal uptake by plants (Wenzel et al. 2002; Vazquez et al. 2006) or remain unchanged (Martinez-Alcala et al. 2009).

However, the reduction of metal solubility with increasing pH might be due to adsorption on the soil surface or the precipitation of metals as phosphates or the formation of new aggregate structures within the repacked soil (Luster et al. 2008). Therefore, despite of the increase in DOC concentrations, the observed decrease in metal solubilities in the rhizosphere SPW compared to bulk soil might be attributed to the increase of soil solution pH, indicates that the metals solubilities in these studied soils was driven by soil pH mainly.

Despite the fact that DOC accounts for a small portion of SOM only, it is generally accepted that DOC can affect the nutrient and contaminant mobility, thus, facilitating metal release from the soil solid phase to the SPW through the formation of metals (i.e. Zn, Pb Cu, Cd and Ni)-DOC complexes (Weng et al. 2002; Kaiser et al. 2002; Schwab et al. 2005). Similarly, Wenzel et al. (2003) found a significant correlation between Ni and DOC concentrations in SPW. This hypothesis is compatible only with the solubility of Zn. Linear regression analysis showed a significant positive relationship ($r^2 = 0.70$, $P < 0.01$) between DOC concentrations and solubility of Zn.

Contrary to these findings, our results for Cd and Pb may be in line with the explanation of Benjamin and Leckie (1981a, b) who reported that complex formation by DOC can decrease the metal solubility through adsorption of metals–DOC complexes on the soil surface. Likewise, Kim et al. (2010a) found that Indian mustard growth has increased the soil solution pH and resulted in decreasing metal solubilities in spite of the increasing in DOC concentration, which was explained by the increase of metal binding onto the soil surface through deprotonation due to the increase in pH value (Naidu and Harter 1998).

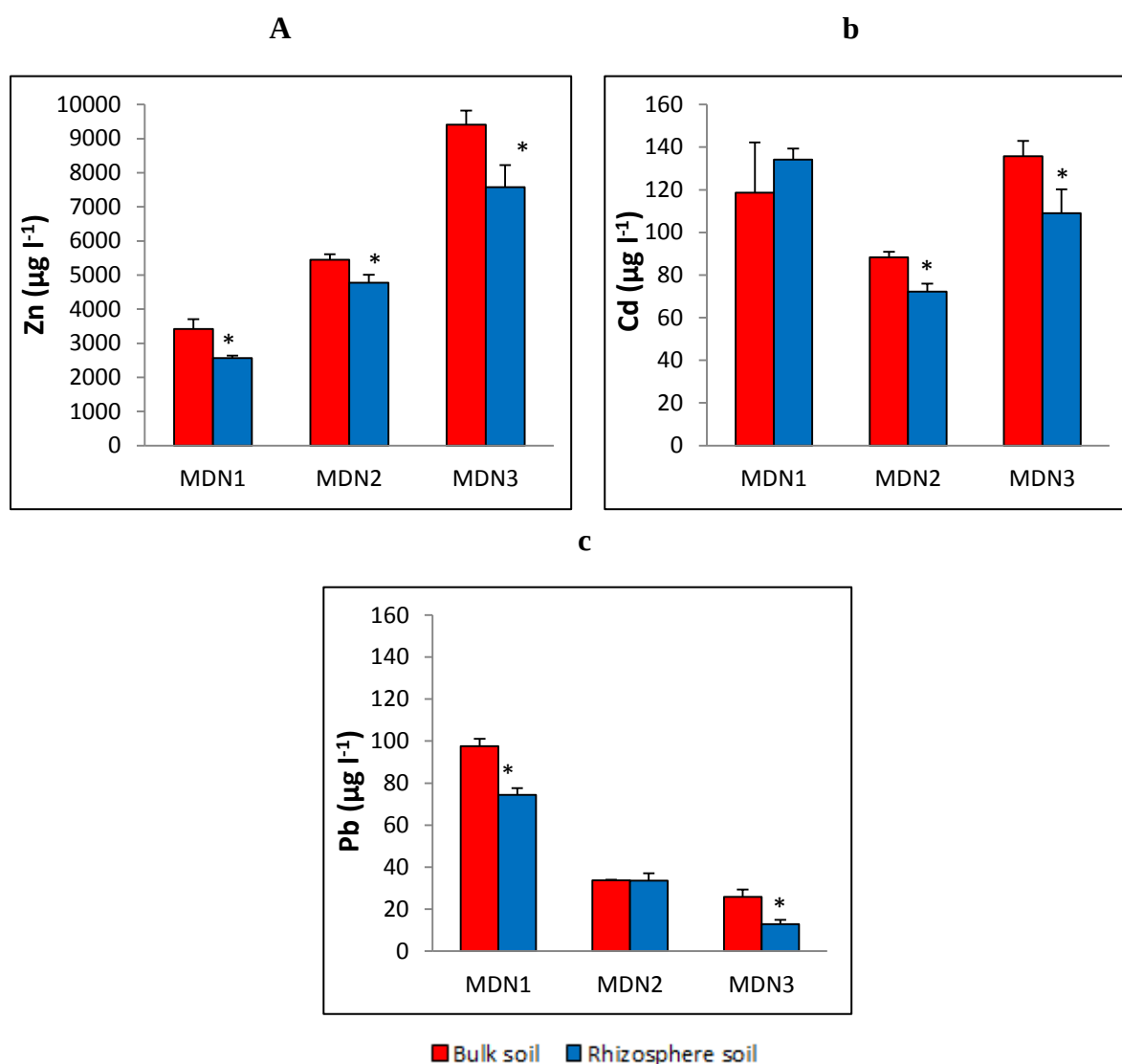


Figure 4.1.3: Total dissolved concentrations of Zn (a), Cd (b) and Pb (c) in the bulk soil solution and in the rhizospheric soil solution of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days. Bars represent standard errors (n = 3). Significantly different values by comparison with the bulk soil, * $P < 0.05$.

Therefore, depending on the foregoing, it can be concluded that DOC concentrations increasing during plant growth might have an opposite effect by reducing the impact of increasing pH on the metal solubilities, given that the SPW pH is the most important chemical factor controlling the availability of metals and that the increase of the rhizosphere pH decreased the chemical activity of most metals. Rhizosphere alkalisation may thus be an important mechanism for the phytoextraction of the studied PTE by *Populus euramericana* Dorskamp plants in contaminated technosols. The general increase in SPW pH by this plant for the majority of soils studied here indicated the potential use of this plant for phytostabilization.

3.4 Plant growth and metals uptake

The rhizobox experiment of *Populus euramericana* Dorskamp grown in contaminated MDN soils for 60 days showed an accumulation of varying amounts of PTE in the different plant organs (Fig. 4.1.5). Compared to other studied elements, the accumulation of Zn was found maximum, whereas, Cd was found to be minimum in all plant organs for all studied soils.

The plant organs (leaves, roots and stems) dry weight (DW) is shown in (Fig. 4.1.4). The highest shoot DW was observed for MDN1, followed by MDN3 soil and the lowest shoot DW was observed for MDN2 soil. Contrary to shoot biomass, root biomass for MDN3 was found maximum followed by MDN1 and the lowest was recorded also for MDN2 soil.

It can be seen from Fig. 4.1.5A that plant roots contained higher concentration of Zn than shoots for both MDN1 and MDN2 and the opposite was observed for MDN3. This might be attributed to the high DOC concentrations and the lowest rhizosphere pH value for MDN3 compared to the other soils. Therefore, Zn uptake by plants leaves was related to SPW Zn concentrations ($r^2 = 0.72$, $P < 0.01$). It is well reported that the large Zn concentrations in plant leaves associated with small concentrations in roots, indicating high metal uptake and efficient translocation from root to shoots (Utmazian et al. 2007). In contrast, the low Zn concentrations in plant shoots for both MDN1 and MDN2 samples might be attributed to the fact that a significant amount of Zn accumulated in plant roots, indicating that plant translocation from root to shoots is poor.

Leaves Cd uptake was more closely related to the Cd SPW concentration ($r^2 = 0.45$, $P < 0.05$). Fig. 4.1.5B showed that the highest Cd plant shoots and root concentration was observed for MDN1 compared to other soils. This indicated that plant Cd uptake and translocation was dependent on both SPW Cd and total soil Cd concentration, implying the

dependence of metal uptake by plants on the change in dissolved Cd concentration induced by pH increase related to plant growth. Our results were in agreement with that of Kim et al. (2010b) which found the same trend in green house potted experiment.

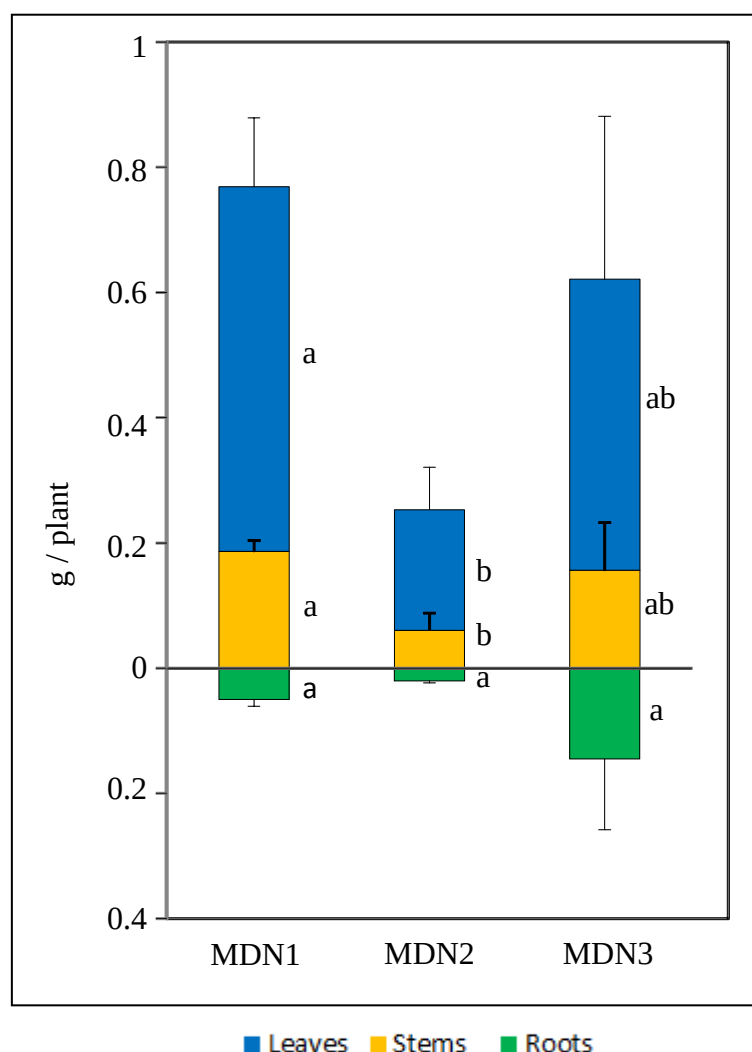


Figure 4.1.4: Biomass (dry weight) of the different plant organs (leaves, stems, roots) of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days. Bars represent standard errors ($n = 3$). Treatments assigned the same letter indicate no significant difference between the means ($P \leq 0.05$).

Our results were also in line with that obtained by Bose and Bhattacharyya (2008), who found that Zn, Cd and Pb, concentrations were highest in roots and lower in shoots in wheat plant. The low Cd concentrations in plant shoots compared to Zn and Pb might be attributed to the chemical similarity between Cd and Zn which influences the Cd plants contamination (Hamon et al. 1998). Therefore, the higher Zn concentration in SPW competes directly with

Cd resulting in the reduction of Cd uptake by plants (McLaughlin et al. 1995; Grant and Bailey 1997).

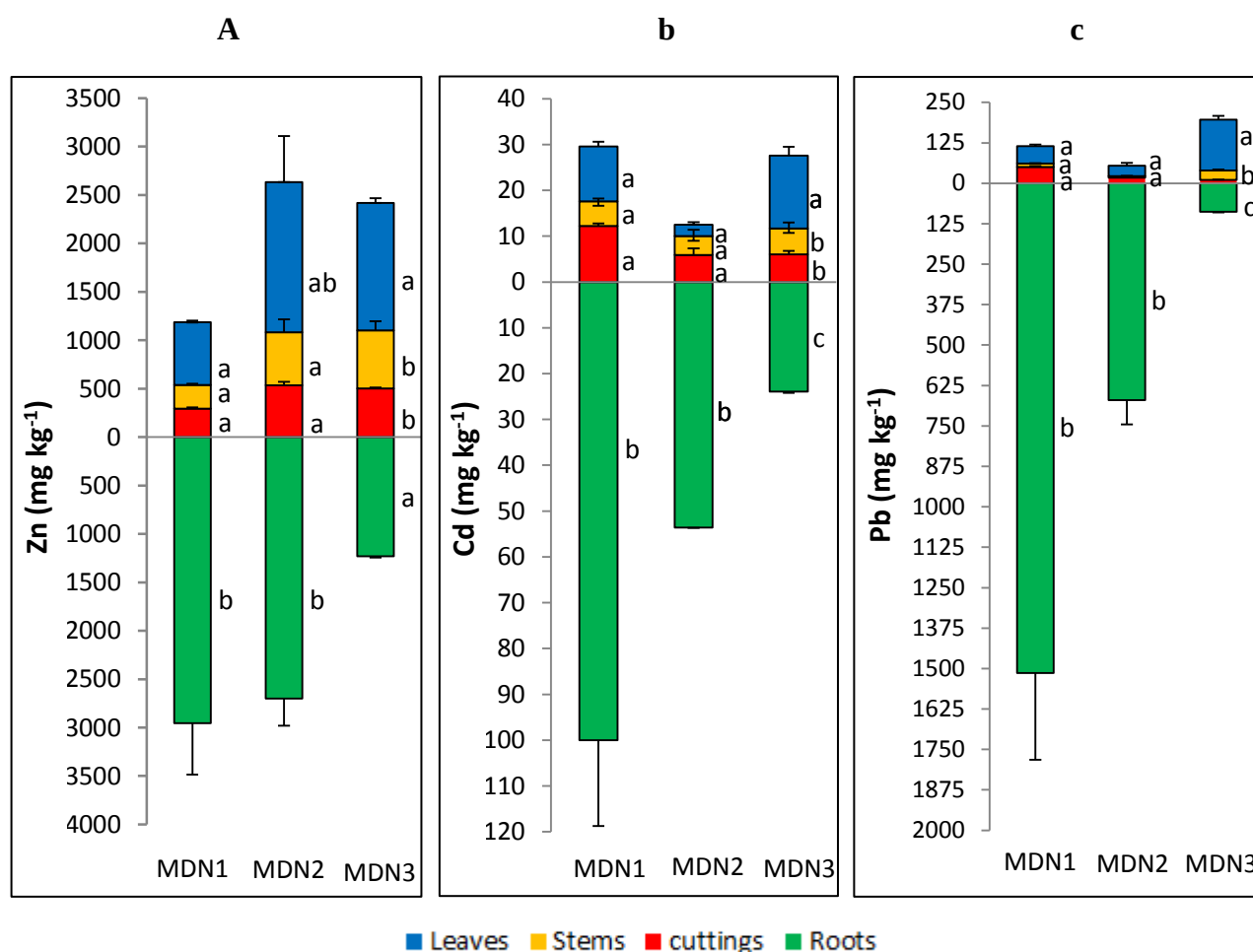


Figure 4.1.5: Concentrations of Zn (a), Cd (b) and Pb (c) in the different organs (leaves, stems, cuttings and roots) of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol during 60 days. Bars represent standard errors (n = 3). Treatments assigned the same letter indicate no significant difference between the means ($P \leq 0.05$).

As for Zn, plant roots contained higher concentration of Pb than shoots (Fig. 4.1.5C) the content of Pb in plant roots was linearly related to Pb concentration in rhizosphere soil solution ($r^2 = 0.66$, $P < 0.01$). In the other hand, no significant correlations was observed between Pb concentrations in plant leaves with rhizosphere SPW Pb concentrations indicating that the translocation of Pb from roots to shoots is limited and thus Pb accumulated in roots. This result is in agreement with Yang et al. (2010) who reported that irrespective of plant species, roots accumulated more Pb and Zn than plant shoots. Murillo et al. (1999) and Liu et

al. (2000) observed similar results for Pb and other metals translocation from roots to shoots in sunflower and Indian mustard plants.

From the foregoing, the difference in studied metals concentration between plant roots and shoots might be attributed to the explanation given by Cobbett and Goldsbrough (2002). It shows the ability of plant to develop many strategies such as chelation with phytochelatins (PCs) and compartmentation into cytosol to reduce metals uptake. It might be also attributed to the ability of plant root cell wall to retain and/or actively transport Pb from the cell wall back to soil, resulting in the decrease of metals uptake and accumulation by the root (Nishizono et al. 1987).

As for Cd, the low Pb plant uptake compared to Zn might be attributed to that of multi metal contamination as the presence of some metals may affect the solubility and plant uptake of the other metals. This is in line with Nan et al. (2002) who found that the total Zn content of soil lowered the accumulation of Pb in the wheat grains.

4. Conclusions

The present study demonstrated that a significant change in the SPW pH and DOC concentrations was observed after *Populus euramericana* Dorskamp growth in contaminated technosols. The presence of these plants increased rhizosphere SPW pH by 0.1 to 0.6 units compared to bulk soil. DOC concentrations also increased irrespective of soil type or total metal concentrations compared to bulk soil. Plant growth reduced the solubility of Zn, Pb and Cd concentrations due to pH increases or through the formation of metals-DOC complexes.

These changes in rhizosphere SPW properties influenced the plant metals uptake. The higher concentrations of studied metals were found in plant roots compared to plant shoots. The restricted transfer of metals to the plant shoots confirms the potential role of this species in the 185hysic185ation185n of metals and phytostabilisation.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Baghdad, Iraq) for the financial support, and are grateful to Florie Miard (Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures I, Orleans, France) for their excellent technical assistance.

References

- Benjamin, M.M., and Leckie, J.O., (1981a) Multiple-site adsorption of Cd, Cu, Zn, and Pb on amorphous iron oxyhydroxide. *J Colloid Interface Sci* 79:209–221.
- Benjamin, M.M., and Leckie, J.O., (1981b) competitive adsorption of Cd, Cu, Zn, and Pb on amorphous iron oxyhydroxide. *J Colloid Interface Sci* 83:410-419.
- Bernal, M.P., McGrath, M.P., (1994) Effects of pH and heavy-metal concentrations in solution culture on the proton release, growth and elemental composition of *Alyssum murale* and *Raphanus sativus* L. *Plant Soil* 166:83–92.
- Bonhomme, L., Barbaroux, C., Monclus, R., Morabito, D., Berthelot, A., Villar, M., Dreyer, E., Brignolas, F., (2008) Genetic variation in productivity, leaf traits, and carbon isotope discrimination in hybrid poplars cultivated on contrasting sites. *Ann For Sci* 65:2–8.
- Bose, S., Bhattacharyya, A.K., (2008) Heavy metals accumulation in wheat plant grown in soil amended with industrial sludge. *Chemosphere* 70:1264–1272.
- Bravin, M.N., Marti, A.L., Clairotte, M., Hinsinger, P., (2009) Rhizosphere 186hysic186ation – a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper contaminated soil. *Plant Soil* 318:257–268.
- Cattani, I., Fragoulis, G., Boccelli, R., Capri, E., (2006) Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere* 64:1972-1979.
- Chantigny, M.H., (2003) Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices. *Geoderma* 113:357-380.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., (2002) Phytochelation and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53:159–182.
- Curl, E.A., Truelove, B., (1986) *The Rhizosphere*. Springer, Berlin, New York, p. 286.
- Darrah, P.R., Jones, D.L., Kirk, G.J.D., Roose, T., (2006) Modelling the rhizosphere: a review of methods for ‘upscaling’ to the whole-plant scale. *Eur J Soil Sci* 57:13-25.
- Di, Baccio, D., Castagna, A., Tognetti, R., Ranieri, A., Sebastiani, L., (2014) Early responses to cadmium of two poplar clones that differ in stress tolerance. *Plant Physiol* 171: 1693-1705.
- Durand, T.C., Hausman, J.F., Carpin, S., (2010) Zinc and cadmium effects on growth and ion distribution in *Populus tremula* x *Populus alba*. *Biol. Plant.* 54: 191-194.

- Durand, T.C., Baillif, P., Albe'Ric, P., Carpin, S., Label, P, Hausman JF, Morabito D (2011) Cadmium and zinc are differentially distributed in *Populus tremula* x *P. Alba* exposed to metal excess. *Plant Biosys* 145:397–405.
- Ernst ,W.H.O., (1996) Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Appl Geochem* 11:163–167.
- Fitz, W.J., Wenzel, W.W., Zhang, H., et al. (2003) Rhizosphere characteristics of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and monitoring of phytoremoval efficiency. *Environ Sci Technol* 37:5008-5014.
- Gahoonia, T.S., Claassen, N., Jungk, A., (1992) Mobilization of phosphate in different soils by ryegrass supplied with ammonium or nitrate. *Plant Soil* 140:241–248.
- Gonzaga, M.I.S., Ma, L.Q., Santos, J.A.G., Matias, M.I.S., (2009) Rhizosphere characteristics of two arsenic hyperaccumulating *Pteris* ferns. *Sci Total Environ* 407:4711–4716.
- Grant, C.A., Bailey, L.D., Harapiak, J.T., Flore, N.A., (2002) Effect of phosphate source, rate and cadmium content and use of *Penicillium bilaii* on phosphorus, zinc and cadmium concentration in durum wheat grain. *J Sci Food Agric* 82:301–8.
- Hamon, R.E., McLaughlin, M.J., Naidu, R., Correll, R., (1998) Long-term changes in cadmium bioavailability. *Environ Sci Technol* 32:3699–703.
- Haynes, R.J., (1990) Active ion uptake and maintenance of cation–anion balance: a critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant Soil* 126:247–264.
- Hees, P.A.W.V., Lundstrom, U.S., Giesler, R., (2000) Low molecular weight organic acids and their complexes in soil solution-composition, distribution and seasonal variation in three podzolized soils. *Geoderma* 94:173–200.
- Hinsinger, P., (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv Agron* 64:225-265.
- Hinsinger, P., (2001) Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In: Gobran GR, Wenzel WW, Lombi E (eds) *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, pp 25-41.
- Hinsinger P, Plassard C, Jaillard B (2005) Rhizosphere: a new frontier for soil biogeochemistry. *J Geochem Explor* 88:210–213.
- Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., Zech, W., (2002) The composition of dissolved organic matter in forest soil solutions: changes induced by seasons and passage through the mineral soil, *Org. Geochem* 33:307–318.
- Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J.H., Michalzik, B., Matzner, E., (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Science* 165:277-304.

- Khalid, M., Soleman, N., Jones, D.L., (2007) Grassland plants affect dissolved organic carbon and nitrogen dynamics in soil. *Soil Biol Biochem* 39:378–381.
- Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I.K., (2010a) Influence of Indian mustard (*Brassica Juncea*) on rhizosphere soil solution chemistry in long – term contaminated soils: A rhizobox study. *J Environ Sci* 22:98–105.
- Kim, K. R., Owens, G., Naidu, R., (2010b) Effect of Root-Induced Chemical Changes on Dynamics and Plant Uptake of Heavy Metals in Rhizosphere Soils. *Pedosphere* 20:494–504
- Kirk, G.J.D., Santos, E.E., Findenegg, G.R. (1999) Phosphate solubilisation by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. *Plant Soil* 211:11–8.
- Knight, B., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Shen, Z.G., (1997) Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant Soil* 197:71-78.
- Knight, B.P., Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., (1998) Determination of chemical availability of cadmium and zinc in soils using inert soil moisture samplers. *Environ Pollut* 99:293–298.
- Lim, J.M., Salido, A.L., Butcher, D., (2004) Phytoremediation of lead using Indian mustard (*Brassica juncea*) with EDTA and electrodrugs. *Microchem J* 76:3–9.
- Liu, D., Jiang, W., Liu, C., Xin, C., Hou, W., (2000) Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]. *Bioresour Technol* 71 :273–277.
- Lorenz SE, Hamon RE, Holm PE, Domingues HC et al. (1997) Cadmium and zinc in plants and soil solutions from contaminated soils. *Plant Soil* 189:21–31.
- Lorenz SE, Hamon RE, McGrath SP (1994) Differences between soil solutions obtained from rhizosphere and non-rhizosphere soils by water displacement and soil centrifugation. *Eur J Soil Sci* 45:431-438.
- Luo YM, Christie PAJ, Baker M (2000) Soil solution Zn and pH dynamics in non rhizosphere soil and in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* grown in a Zn/Cdcontaminated soil, *Chemosphere* 41:161–164.
- Luster J, Menon M, Hermle S, Schulin R, Georg-Gunthardt MS, Nowack B (2008) Initial changes in refilled lysimeters built with metal polluted topsoil and acidic or calcareous subsoils as indicated by changes in drainage water composition. *Water Air Soil Pollut* 8:163-176.

- Martinez-Alcala I, Clemente R, Bernal MP (2009) Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. growing in a high- metal calcareous soil. *Water Air Soil Pollut* 201:283–293.
- McLaughlin MJ, Maier NA, Freeman K, Tiller KG, Williams CMJ, Smart MK (1995) Effect of potassic and phosphatic fertilizer type, fertilizer Cd concentration and zinc rate on cadmium uptake by potatoes. *Fert Res* 40:63–70.
- Moritsuka N, Yanai J, Kosaki T (2000b) Non-destructive method for determining temporal and spatial changes of the soil solution chemistry in the rhizosphere. *Soil Sci Plant Nutr* 46:713-719.
- Murillo JM, Maraño T, Cabrera NF, Lopez R (1999) Accumulation of heavy metals in sunflower and sorghum plants affected by the Guadiamar spill. *Sci Total Environ* 242:281-292.
- Naidu R, Harter RD (1998) Effect of different organic ligands on cadmium sorption by and extractability from soils. *Soil Sci Soc Am J* 62:644–650.
- Nan Z, Zhao C, Li J, Chen F, Sun W (2002) Relations between soil properties and selected heavy metal concentrations in spring wheat grown in contaminated soils. *Water Air Soil Pollution* 133:205–213.
- Navarro MC, Pe'rez-Sirvent C, Marti'nez-Sa'nchez MJ, Vidal J, Tovar PJ, Bech J (2008) Abandoned mine sites as a source of contamination by heavy metals: a case study in a semi arid zone. *J Geochem Explor* 96:183–193.
- Nishizono H, Ichilawa H, Suzuki S, Ishii F (1987) The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*. *Plant Soil* 101:15–20.
- Nye PH (1981) Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant Soil* 61:7–26.
- Pottier M, García de la Torre SV, Victora C, Davida CL, Chalot M, Thomine S (2015) Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environ Pollut* 199: 73-82.
- Qasim B, Motelica-Heino M (2014) Potentially toxic element fractionation in technosols using two sequential extraction schemes. *Environmental Science and Pollution Research* 21:5054 – 5065.
- Qasim B, Motelica-Heino M, Joussein E, Soubrand M, Gauthier A (2015) Potentially toxic element phytoavailability assessment in Technosols from former smelting and mining areas. *Environ Sci Pollut Res* 22:5961–5974.

- Razo I, Carrizales L, Castro J, Diaz-Barriga F, Montoroy M (2004) Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water Air Soil Pollut* 152:129–152.
- Reeves RD and Baker AJM (2000) Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD (eds) *Phytoremediation of Toxic Metals*. Wiley-Interscience, New York, pp 193–230.
- Roemkins PFAM, Bouwman LA, Boon GT (1999) Effect of plant growth on copper solubility and speciation in soil solution samples. *Environ Pollut* 106 :215–231.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar PBAN, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I et al. (1995) Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13:468–474.
- Sas L, Rengel Z, Tang C (2001) Excess cation uptake and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. *Plant Science* 160:1191–1198
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA, Hendershot WH (1997) Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air Soil Pollut* 100:133–149.
- Schwab AP, He Y, Banks MK (2005) The influence of organic ligands on the retention of lead in soil. *Chemosphere* 61:856–866.
- Tao S, Liu WX, Chen YJ, Xu FL et al. (2004) Evaluation of factors influencing root-induced changes of copper fractionation in rhizosphere of a calcareous soil. *Environ Pollut* 129:5–12.
- Uren NC, Reisenauer HM (1988) The role of root exudates in nutrient acquisition. In: Tinker PB, Lauchli A (eds) *Advances in Plant Nutrition*, vol. 3. Praeger, New York, pp 79–114.
- Vazquez S, Agha R, Granado A, Sarro MJ, et al. (2006) Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and as polluted acid soil. *Water Air Soil Pollut* 177:349–365.
- Vijver M, Jager T, Posthuma L, Peijnenburg W (2003) Metal uptake from soils and soil-sediment mixtures by larvae of *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera). *Ecotox Environ Safe* 54:277–289.
- Weng L, Temminghoff EJM, Lofts S, Tipping E, Van Riemsdijk WH (2002) Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil. *Environ Sci Technol* 36:4804–4810.

- Wenzel W W, Brandstetter A, Wutte H, Lombi E, Prohaska T, Stingeder G et al. (2002) Arsenic in field-collected soil solutions and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. *J Plant Nutr Soil Sci* 165:221–228.
- Wenzel WW, Bunkowski M, Puschenreiter M, Horak O (2003) Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environ Pollut* 123:131–138.
- Yanai J, Araki S, Kyuma K (1995) Effects of plant growth on the dynamics of the soil solution composition in the root zone of maize in four Japanese soils. *Soil Sci Plant Nutr* 41:195-206
- Yanai J, Robinson D, Young IM, Kyuma K, Kosaki K (1998) Effects of the chemical form of inorganic nitrogen fertilizers on the dynamics of the soil solution composition and on nutrient uptake by wheat. *Soil Sci Plant Nutr* 202:263-270.
- Yang J, Ma Z, Ye1 Z, Guo X, Qiu R (2010) Heavy metal (Pb, Zn) uptake and chemical changes in rhizosphere soils of four wetland plants with different radial oxygen loss. *J Environ.Sci.22* :69–702.

Chapitre 4.2

Effet de la fertilisation en azote (sous forme de nitrate ou d'ammonium) sur la phytostabilisation du Zn, Pb et Cd par *Populus euramericana* Dorskamp dans les technosols contaminés

Résumé de l'article 5

Dans l'article précédent, nous avons étudié l'effet rhizosphérique de *Populus euramericana* Dorskamp sur la mobilité de Zn, Cd et Pb après deux mois de culture dans des technosols contaminés en utilisant un système de rhizobox en laboratoire.

Dans cet article notre objectif a été d'étudier et de comparer l'effet temporel de l'addition d'azote (sous forme de nitrate et ammonium) sur la stabilisation de Zn, Pb et Cd par *Populus euramericana* Dorskamp en utilisant de jeunes plants cultivés dans des technosols contaminés pendant 35 jours en conditions contrôlées au laboratoire.

La forme chimique de l'azote absorbé par les plantes peut distinctement influencer le pH de la rhizosphère. Il est bien connu que l'azote peut être absorbé par les racines des plantes sous forme de NH_4^+ ou de NO_3^- . Lorsque les plantes absorbent l'azote sous forme de NH_4^+ , les ions H^+ sont libérés pour réguler le pH du milieu et en conséquence, le pH de la rhizosphère diminue. En revanche, l'absorption de NO_3^- par les plantes libère les ions OH^- avec une augmentation du pH de la rhizosphère.

Pour réaliser l'objectif de ce travail, 3 échantillons de sols du site de Mortagne-du Nord (nommé MDN1, MDN2, MDN3 respectivement), ont été collectés pour des horizons de surface (0 – 20 cm), séchés à l'air, tamisés à 2mm et mis en pot au laboratoire (0.5kg de sols sec par pot, cinq répliques pour chaque échantillon). Des jeunes plants de peupliers ont été ajoutés aux pots. Des ajouts d'azote sous forme de nitrate et d'ammonium ont été régulièrement apportés pendant la durée de l'expérience. Un sol témoin (sans fertilisants azotés) de chaque échantillon a été utilisé comme sol de contrôle.

L'effet de l'azote sur le pH de la rhizosphère, les concentrations de carbone organique dissout (COD) et les concentrations des EPT dans la solution du sol a été caractérisé pendant la croissance de *Populus euramericana* Dorskamp sur les mêmes échantillons. Les résultats ont été comparés avec les sols témoins.

Nos résultats ont montré que le pH de l'eau interstitielle rhizosphérique a diminué progressivement avec l'addition de NH_4^+ et a augmenté avec NO_3^- , tandis qu'il a légèrement diminué initialement et ensuite augmenté pour les sols témoins non traités. Les concentrations de COD ont augmenté avec le temps jusqu'à 6 fois par rapport aux valeurs initiales, la plus forte augmentation se produisant avec l'addition de NH_4^+ .

Une augmentation des concentrations totale dissoute des métaux dans l'eau interstitielle rhizosphérique a été observée avec l'addition de NH_4^+ laquelle peut être associée à la diminution du pH rhizosphérique alors que l'inverse a été observé pour le sol témoin et l'addition de NO_3^- .

Finalement, nous pouvons dire que nos résultats suggèrent une stabilisation des métaux par *Populus euramericana* Dorskamp dans des technosols contaminés avec l'addition d'azote.

Article 5: Published in

(*J. Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22: 18759 – 18771)

**Effect of nitrate and ammonium fertilization on Zn, Pb and Cd
phytostabilization by *Populus euramericana* Dorskamp in
contaminated technosol**

Bashar Qasim^{1,2,*}, Mikael Motelica-Heino¹, Sylvain Bourgerie³, Arnaud Gauthier⁴, Domenico Morabito³

¹Institut des Sciences de la Terre d'Orléans (ISTO), UMR-CNRS 7327 Campus Géosciences, Université d'Orléans, France.

²Applied Sciences Department, University of Technology, Baghdad, Iraq.

³LBLGC EA 1207, INRA USC1328, Université d'Orléans, France.

⁴Laboratoire de Génie-Civil et géoEnvironnement (LGCgE), Université de Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, Lille, France.

Abstract

This study aimed at assessing the effect of nitrogen addition under two forms, nitrate and ammonium on the stabilization of Zn, Pb and Cd by *Populus euramericana* Dorskamp grown in contaminated soils for 35 days under controlled conditions. Temporal changes in the soil pore water (SPW) were monitored for pH, dissolved organic carbon (DOC) and total dissolved concentrations of metals in the soils rhizosphere. Rhizospheric SPW pH decreased gradually with NH_4^+ addition and increased with NO_3^- addition up to one unit, whilst it slightly decreased initially then increased for the untreated control soil. DOC increased with time up to 6 times, the highest increase occurring with NH_4^+ fertilization. An increase in the metal concentrations in the rhizospheric SPW was observed for NH_4^+ addition associated with the lowest rhizospheric SPW pH, whereas the opposite was observed for the control soil and NO_3^- fertilization. Fertilization did not affect plant shoots or roots biomass development

compared to the untreated control (without N addition). Metals were mostly accumulated in the rhizosphere and N fertilization increased the accumulation for Zn and Pb while Cd accumulation was enhanced for NH_4^+ addition. Collectively our results suggest metal stabilization by *Populus euramericana* Dorskamp rhizosphere with nitrogen fertilization and are potential for phytostabilisation of contaminated technosol.

Keywords: Potentially toxic elements, Technosol, Phytostabilisation, *Populus euramericana* Dorskamp, Nitrogen fertilizers.

4. Introduction

Industrial operations such as smelting, mining, combustion of fossil fuel and waste disposal cause contamination of soil ecosystems with the release of huge amounts of potentially toxic elements (PTE) (Komarnicki, 2005; Jamali et al., 2009). The exposure to these PTE is considered as a serious threat to plants, humans and the whole environment through its entry into the food chain resulting in phytotoxicity (Pinto et al., 2004). Therefore, one of the main primary challenges for researchers in the field of environmental sciences is to reduce the environmental contamination to limit human health and ecosystems risks (Chigbo et al., 2013; Zhu et al., 2014).

Several traditional methods have been extensively used to remediate contaminated soils and technosol such as 'dig and dump', soil washing and sieving. These approaches are effective but destructive thus not sustainable in terms of consumption of raw materials and waste production and costly for large contaminated sites (Basta et al., 2004; Raicevic et al., 2005; Pandey et al., 2009). Less invasive, low-cost phytoremediation options such as phytostabilization, singly and in combination with in situ stabilization (i.e. aided phytostabilisation) are potential technologies to restore the physical, chemical and biological properties of PTE contaminated soils based on the stabilization of PTE in the plant rhizosphere (Mench et al., 2000; Bolan et al., 2003; Raicevic et al., 2005; Kumpiene et al., 2006, 2008; Phillips et al., 2012).

Rhizospheric soil is a dynamic region where multiple interactions occur in plant roots-soil-microbe system (Darrah et al., 2006). It is characterized by high microbial activity, and is clearly distinct from bulk soil with regard to pH, redox potential and availability of nutrients (Hinsinger et al., 2005). The fate of PTE in soils is influenced by physical and chemical

reactions between the solid components of soil and the liquid phase. Soil factors such as pH, soil organic matter (SOM), texture, redox potential, and temperature (Nyamangara, 1998) and biological processes controlled by soil micro-organisms and plants are key-players in the root zone for the PTE mobility and bioavailability (Chaignon et al., 2002, 2003).

Several studies investigated the effect of root activities on the speciation and bioavailability of PTE such as root-induced pH changes, exudation of organic compounds, N mineralization, soil enzyme activities, nitrification and denitrification (Priha et al., 1999; Norton and Firestone, 1996; Weintraub et al., 2007; Kaiser et al., 2010). Roots can indeed modify the PTE mobility by changing soil pH, electrochemical potentials through element sorption in apoplast and functioning of membrane transporters, and their rhizodeposition or complexation in the rhizosphere, including soluble root exudates and mucilages (Hinsinger, 2001; Lombi et al., 2001; Chaignon et al., 2002). Moreover, the PTE solubility can be increased by the methods of acidification, complexation with chelates and PTE desorption or dissolution when the soluble PTE fraction is depleted (Marschner, 1995; Monsanto et al., 2008).

With a high biomass production and a large capacity to store PTE into the woody organs, trees are good candidates for phytostabilization. Furthermore, these species are often able to explore a large volume of soil, which potentially allows a better phytostabilisation than smaller plants. Among trees under temperate latitude, *Populus* species exhibit the greatest growth rates at the expense of large water and nitrogen requirements (Barigah et al., 2014). For this reason poplars are good candidate for phytoremediation.

The dynamics of the availability of PTE in rhizospheric soils are influenced by N fertilizers. In fact PTE phytoavailability is strongly associated with the pH in the root environment. Therefore it is important to adopt a practicable field method to alter the pH. The altering of the N source is one of the suggested methods for modifying the rhizosphere pH (Nye, 1981; Marschner and Romheld, 1996). Additionally the production of root exudates is a potential source of complexing agents for PTE (Hinsinger, 2001).

The main objective of this study was therefore to investigate the effect of two nitrogen fertilizers (NH_4^+ and NO_3^-) on rhizospheric soil pore water (SPW) pH, dissolved organic carbon (DOC) concentrations, PTE (Zn, Cd and Pb) concentrations in SPW and their uptake by *Populus euramericana* Dorskamp grown in contaminated soils.

2. Materials and method

2.1. Soil sampling

Soil samples used in this study were collected from a metallophyte grassland contaminated with Zn, Pb and Cd located at Mortagne-du-Nord (MDN) in Northern France. This area is adjacent to a former metallurgical site occupied for over 60 years by a Zn smelter unit linked to a sulfuric acid production unit and a Pb smelting unit (Thiry and van Oort, 1999). The geological context is made of the Sand of Ostricourt (Paleocene/ lower Eocene). These are glauconious sand with a medium granulometry, on top of them are the clay alluvial material of the nearby River Scarpe, clays and fine sands rich in organic matter.

Three soil sampling sites named (MDN1, MDN2, and MDN3) were selected for this study according to the level of PTE concentrations (Qasim and Motelica-Heino, 2014) and spatial distribution of the vegetation which essentially consists of *Arabidopsis halleri* L. and *Avena sativa* L. Surface soils (0-20cm) were sampled at each location. The main physico-chemical properties of the selected soil samples are summarized in Table 4.2.1.

2.2. Experimental design and plant analysis

A plant growth experiment was conducted with plastic pots: 0.5kg of dry soil sub-sample taken after homogenizing a larger volume of composite technosol sample was used per pot for each soil location. Stems of *Populus euramericana* Dorskamp with rooting were grown on the soils for 35 days. The experiment consisted of two N fertilization treatments and an untreated control soil (without fertilizer) was included for comparison. The N treatments were NH_4Cl and KNO_3 which were applied at 20 mg N kg^{-1} on days 7, 14, 21 and 28 by mixed with distilled water used to maintain 80% of the water holding capacity (WHC), whereas, only distilled water only was applied for the untreated control soils. Each experiment was replicated 5 times. The experiment was thus performed in forty-five pots ($3 \text{ soil samples} \times 3 \text{ treatments} \times 5 \text{ replicates}$ for each soil).

Woody stem cuttings obtained from 1-year-old cutback stems of *Populus euramericana* Dorskamp genotype were planted into sand. After rooting (15 days), plants were transferred into pots (one plant per pot) containing the contaminated soils. Concomitantly plants were pruned in order to make sure that the new leafy stems were entirely formed while plants were exposed to PTE.

Plants were cultivated in a controlled environmental growth chamber (20 – 22°C, 14h day /10h night length, 150 μ E m⁻²s⁻¹ of light intensity and 80% relative humidity) for the whole duration of the experiment. At the end of the experiment, the plants were harvested, washed thoroughly with tap water and then rinsed with distilled water. Each plant was separated into roots, woody stem cuttings (correspond to the organ used to obtained the rooted cuttings), stems and leaves. The different plants organs were oven dried in 70°C for three days until constant weight.

Dried plant organs were then ground with a laboratory grinder and 200mg ($\pm$ 0.5mg) of each plant organ was digested with a pressurized closed-vessel microwave system (Multiwave 3000, Anton Paar GmbH, Germany). Microwave polyfluoroacetylene PFA-teflon vessels were cleaned before each digestion using 10ml of aqua regia (HNO₃/HCl, 1:3v/v), heated for 20min. at 200°C and then rinsed with double deionized water. Blanks were processed in a method identical to the samples. ICP–MS (Finnigan Element XR, Thermo Electron, Germany) measurements were carried out to determine the plant PTE concentrations in the different organs.

2.3. Soil solution collection and analysis

Rhizospheric SPW was collected five times at regular intervals during the cultivation period using Rhizon soil moisture samplers (Rhizosphere Research Products, Wageningen, The Netherlands). Distilled water was added to the soils to maintain 80% of the WHC. The system was allowed to equilibrate for 24hr before SPW collections.

The collected SWP was separated into several sub-samples for analysis. The extracted soil solutions were used for the determination of pH, DOC concentrations, and PTE total dissolved concentrations. SPW pH was determined using a combined pH-EC meter (WTW, ProfiLine 1970i, Germany). DOC was analyzed using an automatic carbon analyzer (Shimadzu© TOC 5000A). SPW were analyzed with HR-ICP-MS (Finnigan Element XR, Thermo Electron, Germany).

2.4. Statistical analysis

Results were analyzed with the SPSS statistical software package (SPSS, Chicago, IL, USA). Means are expressed with their standard error and were compared by ANOVA. In each

case the number of replicates (n) is indicated. Statistical tests were considered significant at $P \leq 0.05$.

Table 4.2.1: Physico-chemical characteristics of the selected samples from Mortagne-du-Nord (MDN) (n=3; $\pm$ standard deviation).

Parameters	MDN1	MDN2	MDN3
pH-H ₂ O	6.92 $\pm$ 0.12	6.35 $\pm$ 0.34	6.14 $\pm$ 0.17
EC (μ s.cm ⁻¹)	112.27 $\pm$ 3.85	112.64 $\pm$ 7.41	113.71 $\pm$ 1.93
CEC (c mol(+) kg ⁻¹)	7.21 $\pm$ 0.70	8.53 $\pm$ 0.25	6.74 $\pm$ 1.21
TOC %	3.35 $\pm$ 0.94	4.39 $\pm$ 0.14	6.45 $\pm$ 0.10
Clay %	0.95 $\pm$ 0.24	0.86 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.24
Silt %	22.34 $\pm$ 0.35	22.16 $\pm$ 0.41	22.13 $\pm$ 0.34
Sand %	75.45 $\pm$ 0.12	76.84 $\pm$ 1.03	76.66 $\pm$ 0.28
Tot. Zn (mg kg ⁻¹)	7726 $\pm$ 12	3114 $\pm$ 11	3127 $\pm$ 9
Tot. Pb (mg kg ⁻¹)	3551 $\pm$ 10	881 $\pm$ 8	874 $\pm$ 5
Tot. Cd (mg kg ⁻¹)	72 $\pm$ 11	64 $\pm$ 5	51 $\pm$ 6

EC: electrical conductivity, CEC: cation exchange capacity, TOC: total organic carbon

3. Results and discussion

3.1. Rhizospheric soil solution pH and dissolved organic carbon concentration

The temporal variation of rhizospheric SPW pH in untreated control and N treatments for all studied soil samples during the cultivation period are shown in Fig. 4.2.1.

It can be seen that there was a significant difference in the SPW pH between the N treatment and the untreated control sample. For all studied samples at the end of experiment, the NH₄⁺ treatment resulted in the lowest pH value (6.05, 5.43 and 4.96), whereas the NO₃⁻ treatment resulted in the highest pH value (7.90, 7.04 and 6.97) for MDN1, MDN2 and MDN3 samples respectively. Among them, the lowest pH value was observed for the MDN3 sample, whilst, the highest was for the MDN1 sample.

The application of N fertilizers such as (NH₄)₂SO₄, KNO₃ and urea has been considered as one of the main factors causing acidification or alkalization of agricultural soils, and its uptakes by many plants have increased or decreased rhizospheric pH related to the proton

release through nitrification of NH_4^+ or OH^- release through NO_3^- uptake (Bouman et al. 1995).

Monsat et al. (2008) observed a pattern of pH changes similar to our findings in a *Thlaspi caerulescens* rhizospheric soil due to N fertilization. Our results were also consistent with those of Sabir et al. (2013) which showed that nitrogen forms significantly affected the soil pH. These authors reported that the NO_3^- fed plants recorded the maximum soil pH whereas minimum soil pH was recorded where only NH_4^+ was applied. Tachibana et al. (1995) also reported that soil pH decreased as low as 2.9 by application of N fertilizers at high rates in a green tea experiment. Ruan et al. (2000) showed that the application of NH_4^+ to the soil of tea plants resulted in significant reduction in rhizospheric pH due to the cation-anion balance during nutrient uptake by plants.

In the case of the untreated control soils, a change in the pH values was also observed for all studied samples but remained lower from those with N fertilization. Rhizospheric SPW of the untreated controls increased by 0.2 – 0.3 pH units compared to the initial value, which can be explained as a consequence of differential rates in the uptake of cations and anions by plants in order to maintain electrical neutrality within their roots or probably related to changes in Ca concentration. Our findings are also in agreement with that of Knight et al. (1997), which used Rhizon soil moisture samplers and reported an increase in the solution pH between 0.4 and 0.9 units after *Noccaea caerulescens* growth. Tao et al. (2003) also reported an increase in pH in maize rhizospheric soil during the cultivation period.

Globally rhizospheric pH can be influenced by N source via three mechanisms: nitrification/denitrification reactions, displacement of H^+/OH^- adsorbed on the soil solid phase and release/uptake of H^+ by roots in response to $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ uptake by plant roots (Nye, 1981; Marschner and Romheld, 1996; Tang and Rengel, 2003; Silber et al., 2004). It is well known that the uptake of NH_4^+ or NO_3^- by plants depend on their concentrations in soil solution, root absorption and plant growth rate (Richardson et al., 2009). When plants take up NH_4^+ , more cations than anions will be release through proton release to regulate pH and charge balance resulting in rhizosphere pH decreases, whereas uptake of NO_3^- may increase rhizosphere pH through the release of OH^- (Haynes, 1990; Taylor and Bloom, 1998; Hinsinger et al., 2003).

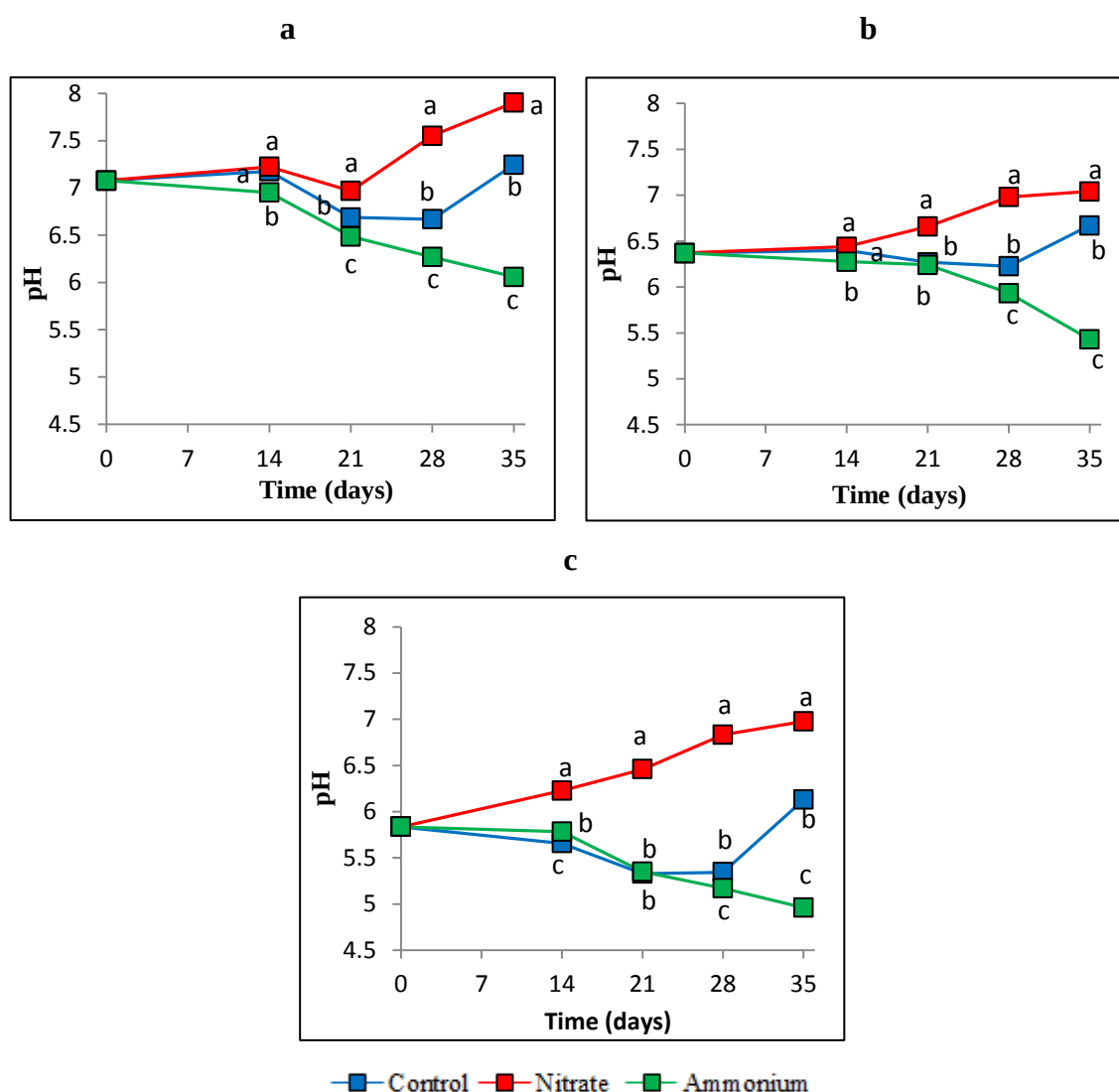


Figure 4.2.1: Effects of nitrogen nutrition on rhizospheric pH of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1 (a), MDN2 (b) and MDN3 (c), during 35 days (n = 5), bars refer to standard error. For each day measurement, letters indicate differences between control and treated soils.

The changes in DOC concentrations within the rhizosphere during the cultivation period are shown in Fig. 4.2.2. DOC concentrations in the rizospheric SPW for the untreated control and N treated soils increased gradually with the cultivated period for all studied samples. Fig. 4.2.2 showed that the N fertilizers application significantly increased the concentrations of DOC for both MDN1 and MDN3 compared to untreated control but not for MDN2. For all studied samples, the highest DOC concentrations at the end of the experiment were recorded for the NH_4^+ treatment.

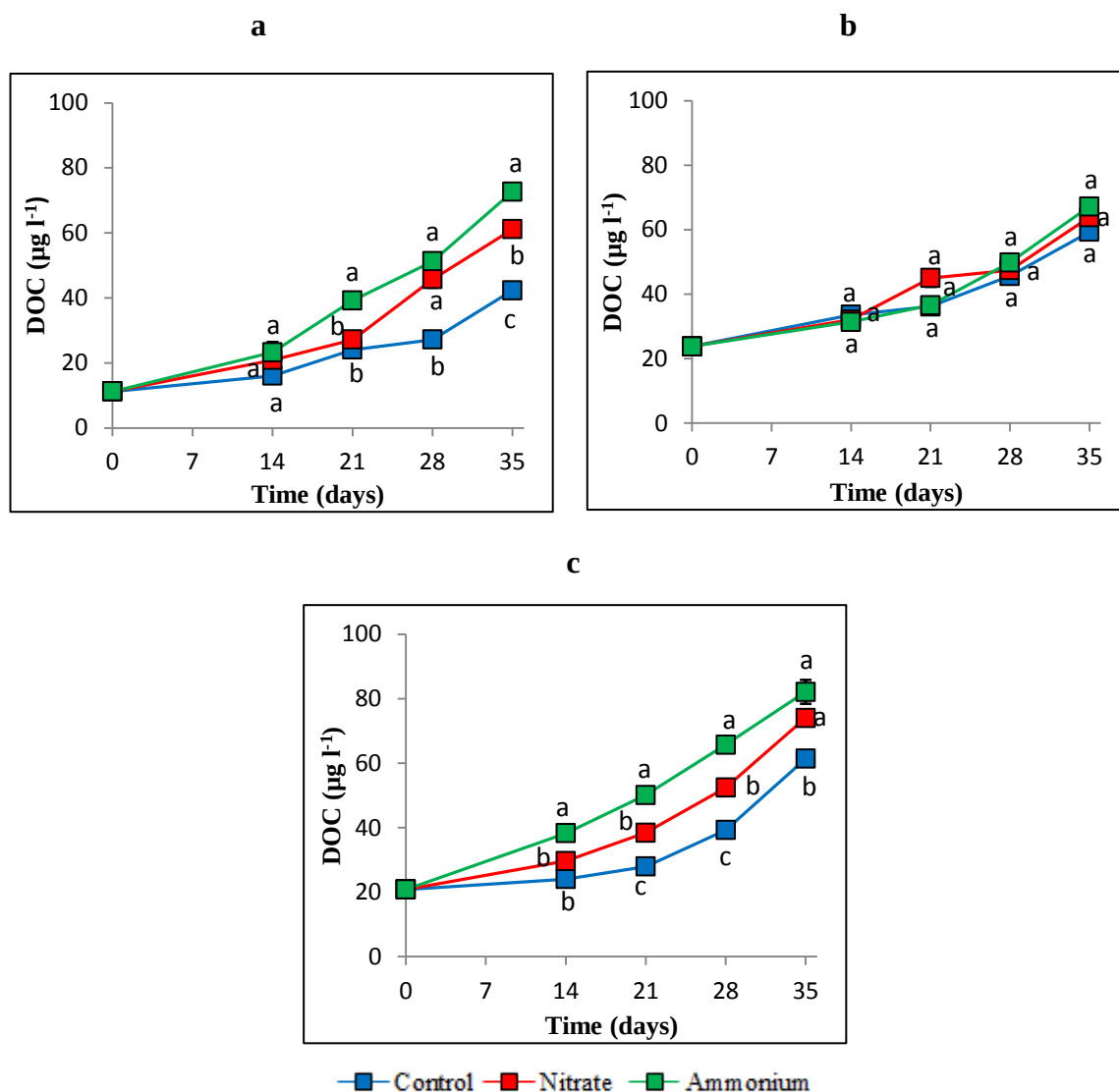


Figure 4.2.2: Effects of nitrogen nutrition on rhizospheric DOC concentrations of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1 (a), MDN2 (b) and MDN3 (c), during 35 days (n = 5), bars refer to standard error. For each day measurement, letters indicate differences between control and treated soils.

There are various components involved in the release of organic carbon into the rhizosphere (Rovira et al., 1979). Soil humus, plant litter and the organic compounds in root exudates are active substances which considered as the main sources of SOM in soils (Kalbitz et al., 2000) which exhibiting strong affinities with respect to PTE. In the literature, many studies have reported that application of N can influence the DOC depending on microbial activity. (Park et al., 2002; Scheuner and Makeschin, 2005; Cory et al., 2004; McDowell et al., 2004)

In this study, the increase in DOC concentrations due to the application of N fertilizers confirms the hypothesis that the increase in microbial activity and utilization of C substrate stimulated the release of DOC in comparison to the untreated control. These findings are in agreement with that of Lakzian et al. (2010) which reported that the application of N fertilizers increased the DOC concentration by 30% in comparison to soils without treatment. Pregitzer et al. (2004) also reported that chronic N fertilization increases the production and leaching of DOC. Similarly, Sitaula et al. (2004) and Curtis et al. (1995) reported that the application of N fertilizers had direct or indirect effects on microbial activity and the release of DOC.

3.2. Zn, Pb and Cd concentrations in rhizospheric SPW

The total dissolved concentrations of Zn, Pb and Cd in the rhizospheric SPW of the untreated control and N fertilized soils during the cultivation period are shown in Fig. 4.2.3, 4.2.4 and 4.2.5 respectively.

A significant difference was observed for Zn concentrations in rhizospheric SPW between untreated controls and treated fertilized soils for all studied soil samples during the cultivation period. Zn concentration in the rhizospheric SPW for MDN1 dropped markedly with the NO_3^- fertilization and increased gradually in the case of the NH_4^+ fertilization, whilst in the untreated control sample, it remained almost constant at the beginning and decreased towards the end of the experiment (Fig. 4.2.3A). For MDN2 and MDN3, Zn rhizospheric SPW concentrations did not differ among them at the beginning of the experiment. However a significant difference was observed among them at the end of the experiment and the highest Zn concentration was recorded for the NH_4^+ treatment whilst the lowest was found for NO_3^- (Fig. 4.2.3B, 4.2.3C) respectively.

Pb total dissolved concentration in the rhizospheric SPW for the untreated control for MDN1 and MDN2 was relatively higher at the beginning and then dropped remarkably at the end of the experiment. On the other hand, Pb concentration gradually decreased and increased with time for the NO_3^- and NH_4^+ treatments respectively. A significant difference between the untreated control and N treatments was observed (Fig. 4.2.4A, 4.2.4B). For MDN3, Pb concentrations in the untreated control increased gradually similarly to that of the NH_4^+ treatment but dropped considerably at the end of the experiment. Gradual decrease in Pb concentration with time was also observed with NO_3^- (Fig. 4.2.4C).

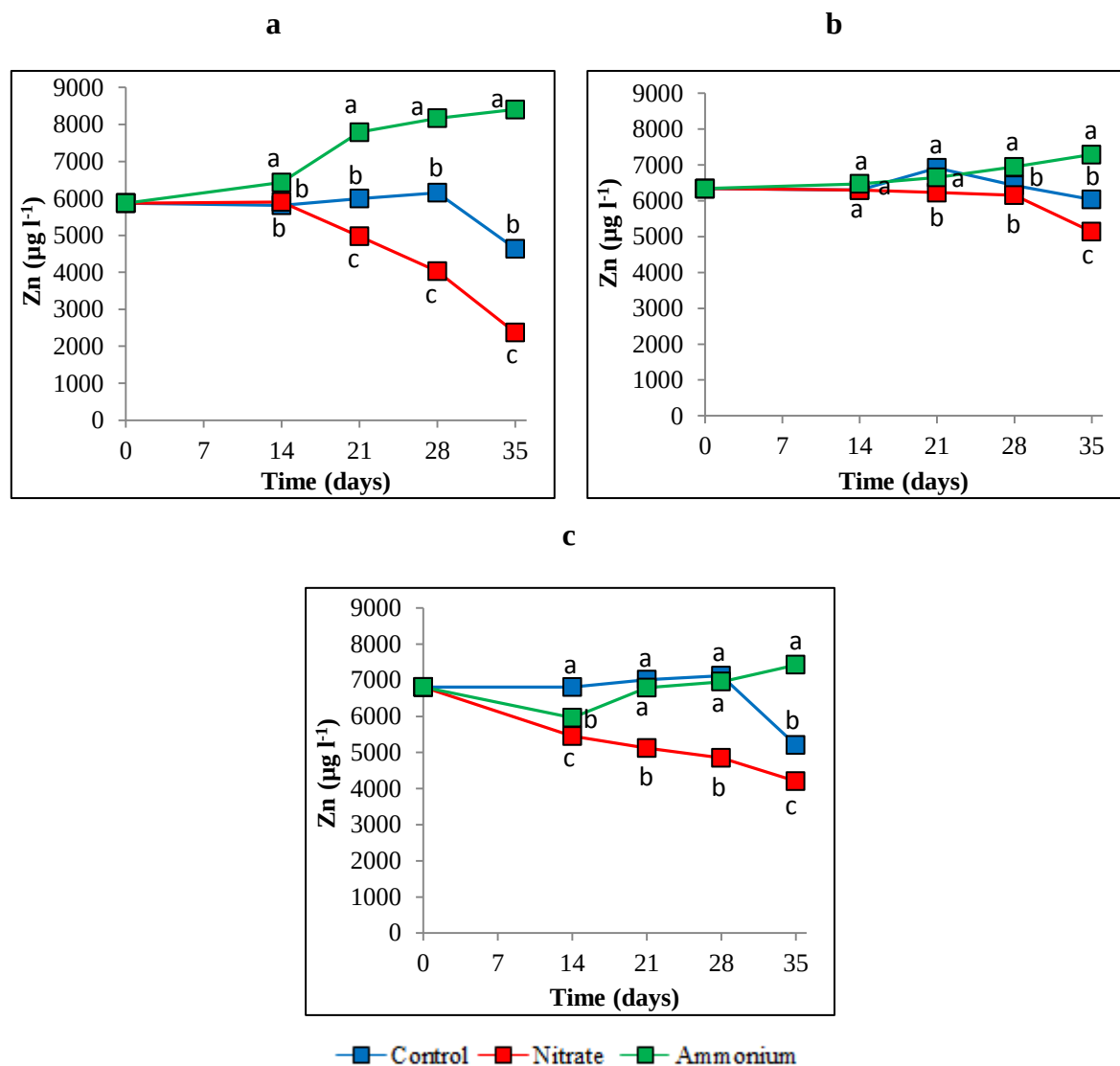


Figure 4.2.3: Effects of nitrogen nutrition on Zn soil pore water of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1 (a), MDN2 (b) and MDN3 (c), during 35 days (n = 5), bars refer to standard error. For each day measurement, letters indicate differences between control and treated soils.

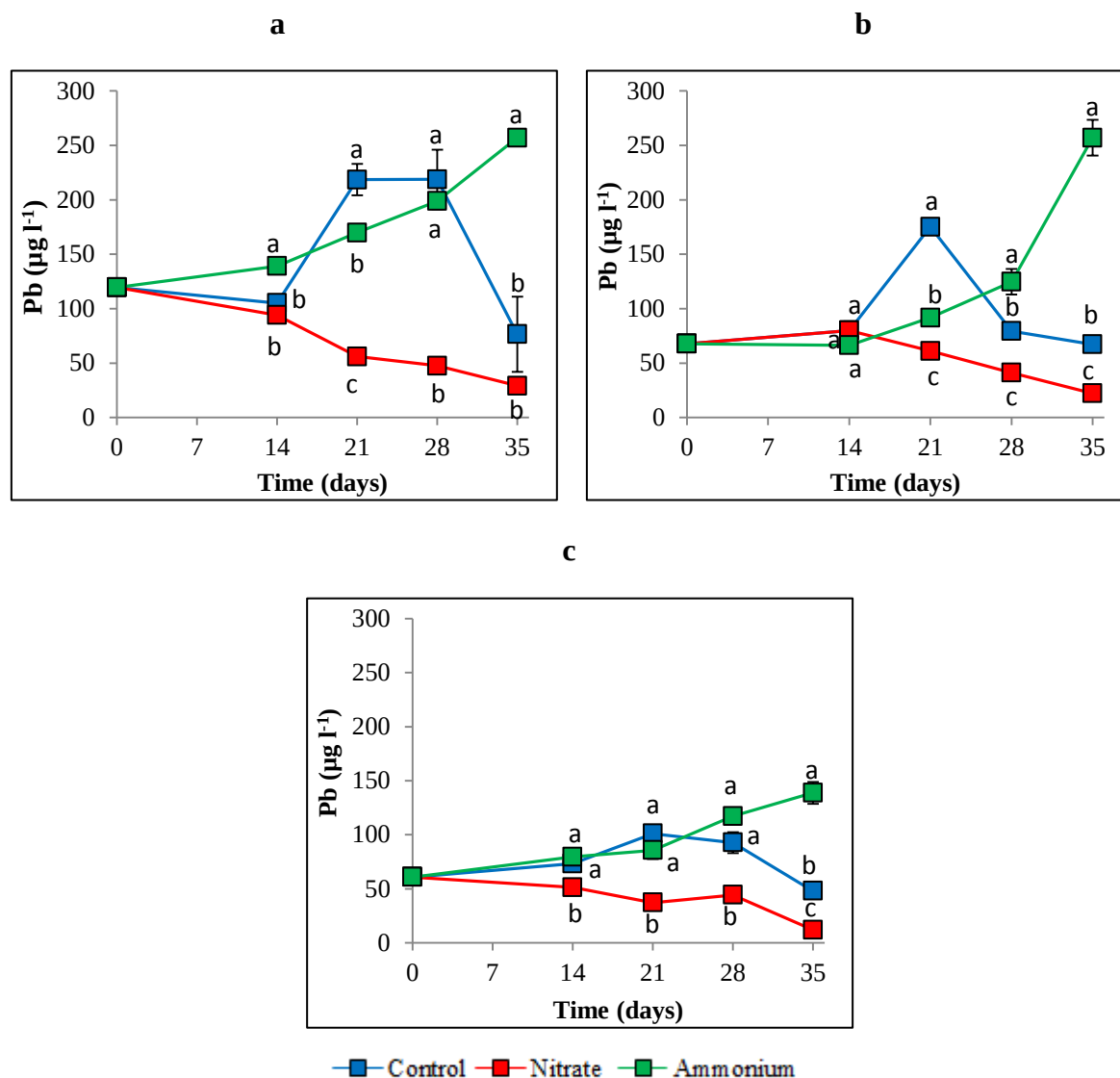


Figure 4.2.4: Effects of nitrogen nutrition on Pb soil pore water of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1 (a), MDN2 (b) and MDN3 (c), during 35 days (n = 5), bars refer to standard error. For each day measurement, letters indicate differences between control and treated soils.

In the case of Cd, total dissolved concentrations in the rhizospheric SPW for MDN1 remarkably increased and decreased with time for NH_4^+ and NO_3^- respectively. In contrast for the untreated control, Cd concentration was higher at the beginning then decreased at the end of the experiment (Fig. 4.2.5A). The same pattern was also observed for MDN2 with the exception of a significant increase at the end of the experiment for the NH_4^+ treatment (Fig. 4.2.5B). For MDN3, Cd concentration trend was similar to that of Pb (Fig. 4.2.5C). The

solubility of Zn showed an increase in the rhizospheric SPW for all studied samples after NH_4^+ addition in comparison to the untreated control and that fertilized with NO_3^- . This can be attributed to decrease in the soil pH, but also to its ability to form selective complexes with DOC compounds due to the higher affinity of Zn for DOC (Kim et al., 2010a).

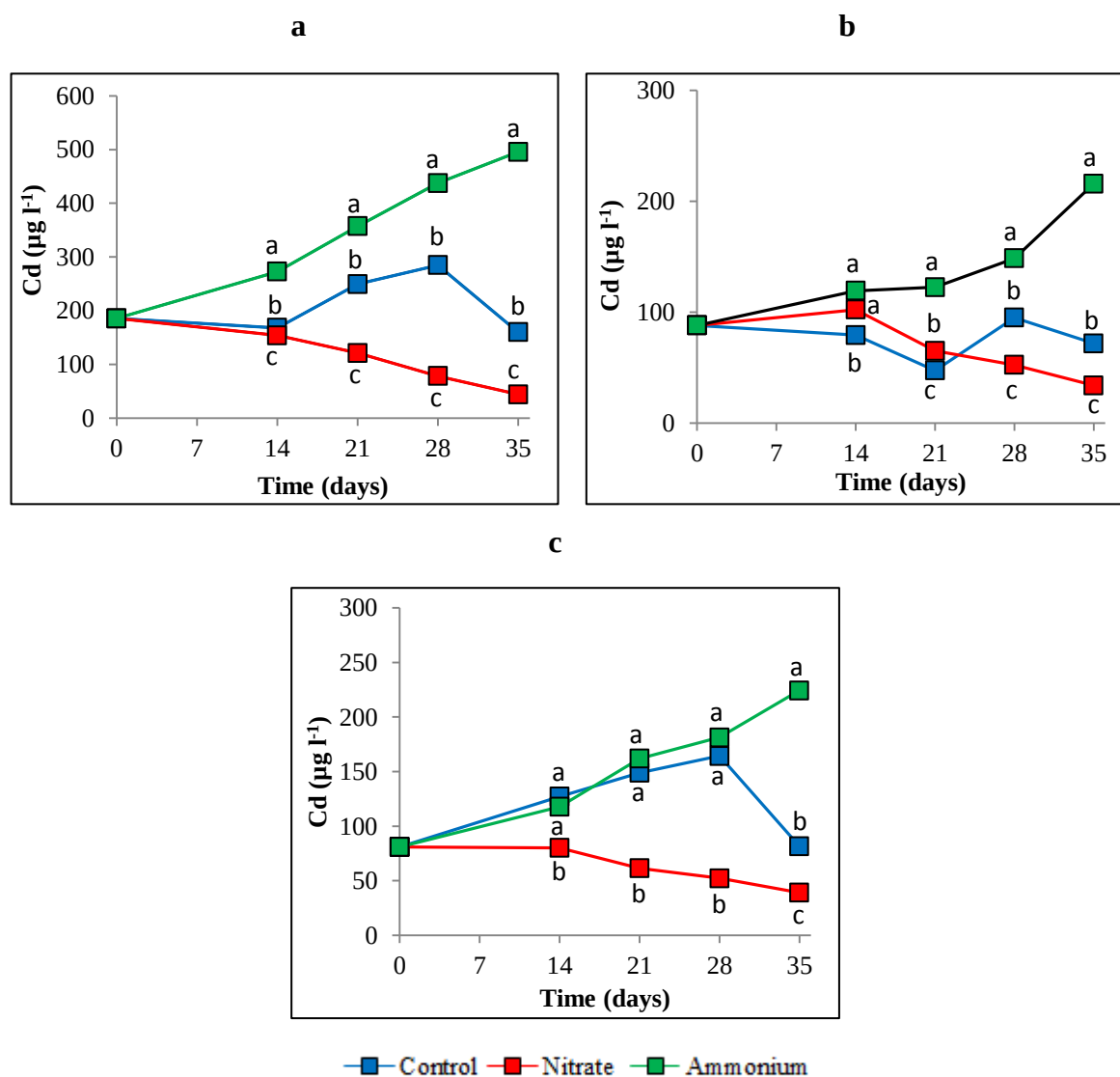


Figure 4.2.5: Effects of nitrogen nutrition on Cd soil pore water of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol, MDN1 (a), MDN2 (b) and MDN3 (c), during 35 days (n = 5), bars refer to standard error. For each day measurement, letters indicate differences between control and treated soils.

In contrast to soils amended with NH_4^+ , Zn, Pb and Cd concentrations decreased in the rhizospheric SPW of untreated control and that fertilized with NO_3^- . The decrease in PTE solubility may be due to the increase in pH in spite of the increase in DOC concentrations. In

fact, Zn is generally relatively insoluble at pH >7 and its solubility decreases with pH (Ross, 1994). Moreover, PTE occurring predominantly as free ion forms are more sensitive to effects arising from differences in pH value (Luo et al., 2001). In fact the decrease in Zn in the SPW in compost- and biochar-amended soils was due to the Zn presence mainly in water-soluble fractions (Beesley et al., 2010). Therefore the increase in pH values due to NO_3^- addition and the competing effect of changes in pH and DOC after plant growth on PTE chemistry might be enhanced by sorption on soil organic and inorganic particle surfaces.

In addition, despite a higher DOC concentration for MDN3, the studied PTE solubility in the rhizospheric SPW increased more for MDN1 than for MDN3 which may be attributed to the competition between cations in the SPW for the DOC binding sites. A high portion of DOC exuded from the root can in fact react with different major cations such as Mg and Ca for the MDN3 sample, whereas, for the MDN1 sample, DOC induced by roots may interact easily with PTE because of less competition for DOC binding sites.

The Pb concentration in the rhizospheric SPW decreased in MDN3 with the lowest pH value even though in the case of NH_4^+ treatment in comparison to both MDN1 and MDN2. This result is in agreement with those of Sauvé et al. (1998) which reported that Pb solubility is higher near neutrality, or which was likely due to formation of Pb organic complexes in soil solution.

In the case of untreated control, the increase of PTE in the SPW at the beginning of the experiment could be attributed to root related processes such as pH decrease and DOC increase, or might be attributed to an exchange reaction by NH_4^+ originating from mineralization of organic N, whereas the decrease at the end of the experiment was attributed to the increasing in the pH value even though the increase in DOC concentrations may favor re-adsorption of PTE onto the soil particles. The addition of organic matter (OM) may influence Zn mobility and increase negatively-charged adsorption sites in the OM-treated soils (Hartley et al., 2010).

Conversely, Zn was immobilized in an acid soil by humic acids isolated from organic materials, (Clemente and Bernal, 2006). In another study on PTE contaminated acidic sandy soils phytostabilised with poplars, the Zn concentration in SPW significantly decreased with the addition of dolomitic limestone in soil that increased the soil pH (Hattab et al., 2014a). The efficiency of assisted phytostabilization using organic amendments such as ramial chipped wood (RCW) and composted sewage sludge (CSS) was studied on contaminated techno-soils. Addition of sewage sludge increased the solubility of Zn due to the formation of

soluble organo-metallic complexes. Moreover, Zn was abundant in the fulvic acid fraction than in the humic acid fraction which may explain its mobility (Hattab et al., 2014b).

3.3. Plant growth and uptake of Zn, Cd and Pb

During the growth period, several plants appeared unhealthy, with visual symptoms of studied metals toxicity. There was foliar necrosis and chlorosis with no significant differences in shoots and root biomass between the treatments and between each plant. The growth disorders and the cases of necrosis and chlorosis cannot be attributed to any direct effect of nitrogen treatments, because the control plants have the same disorders. Localized supply of nitrogen treatments had no significant influence on leaves growth, total area and biomass in comparison to the untreated control sample in all studied samples. There was a little difference among the studied samples. However, the highest leaves biomass was for MDN1 and the lowest was for MDN3.

No significant difference was observed for the leaves dry weight between the untreated control and nitrogen treatments for all studied samples (Fig. 4.2.6A). The same pattern was observed for roots dry weight for both MDN1 and MDN2, whilst, in MDN3, the nitrogen treatments were significantly decreased the root biomass in comparison to untreated control (Fig. 4.2.6C). Contrary to leaves and roots biomass in MDN2, the stem biomass on the untreated control varied significantly, represented the minimum dry weight values in comparison to those of nitrogen treatments, but not for MDN1 and MDN2 (Fig. 4.2.6B). As mentioned above, the shoot biomass did not respond to pH changes, whereas only the root biomass for MDN3 was affected by the pH changes due to NH_4^+ supplied which caused a dramatic yield reduction.

In the literature, many researchers confirmed the effect of N forms on plants shoot and root biomass. Kraus and Staurt (2002) reported that each of NH_4^+ , NO_3^- and $(\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-)$ forms were increased the plant dry matter. Also, Ruan et al. (2004, 2007) showed that the root, shoot and whole tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) dry matter productions were significantly increased by nitrogen fertilization. Similarly, Zhou et al. (2011) reported that a higher dry matter production of cucumber plant resulted from plant fed with NH_4^+ , NO_3^- . However, our results were not in line with their observations but partially similar to that of Monsanto et al. (2008) which observed that no significant difference in *Thlaspi caerulescens* plant dry weight caused by nitrogen treatments compared to the control sample.

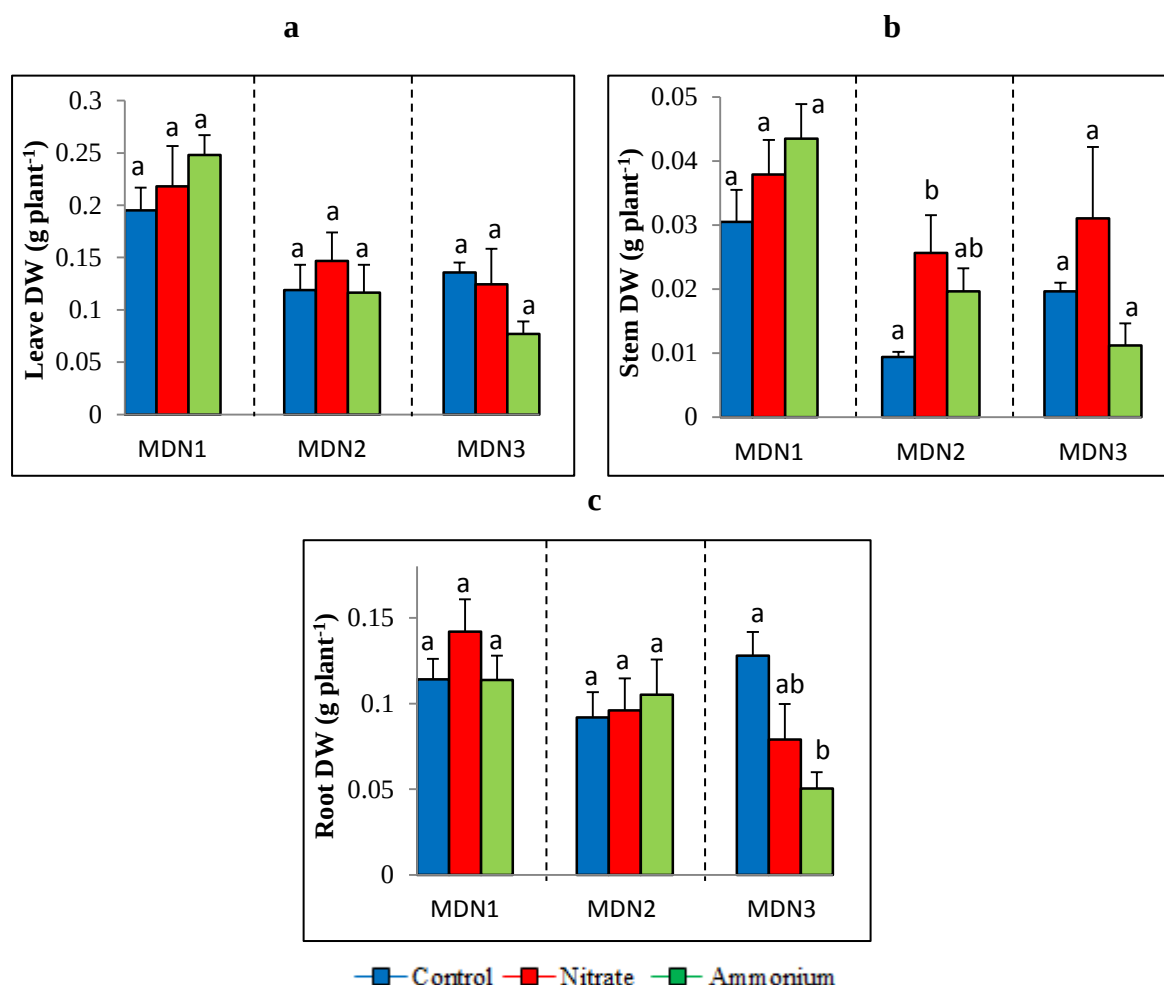


Figure 4.2.6: Effects of nitrogen nutrition on dry weights of leaves (a), stems (b) and roots (c) of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol during 35 days (n = 5), bars refer to standard error, letters indicate differences between treatment for a given soil.

The pots experiment of *Populus euramericana* Dorskamp grown in the studied contaminated soils showed an accumulation of varying amounts of studied PTE among the plant organs, the roots presenting the highest accumulation of Zn, Cd and Pb. Nitrogen fertilization did not affected the plant leaves Zn concentration in all studied samples (Fig. 4.2.7A). Zn concentrations in plant leaves for the untreated control and that fed with NO_3^- and NH_4^+ was similar (no significant difference was observed) and were statistically at par with each other for all studied samples. The same pattern was also observed for Zn concentration in the plant cuttings and stems (Fig. 4.2.7B, 4.2.7D). Zn concentration in poplar roots was similar between the untreated control and that fed with nitrogen treatments in

MDN2, whereas for both MDN1 and MDN3 it was significantly affected by N forms supplied to plants (Fig. 4.2.7C).

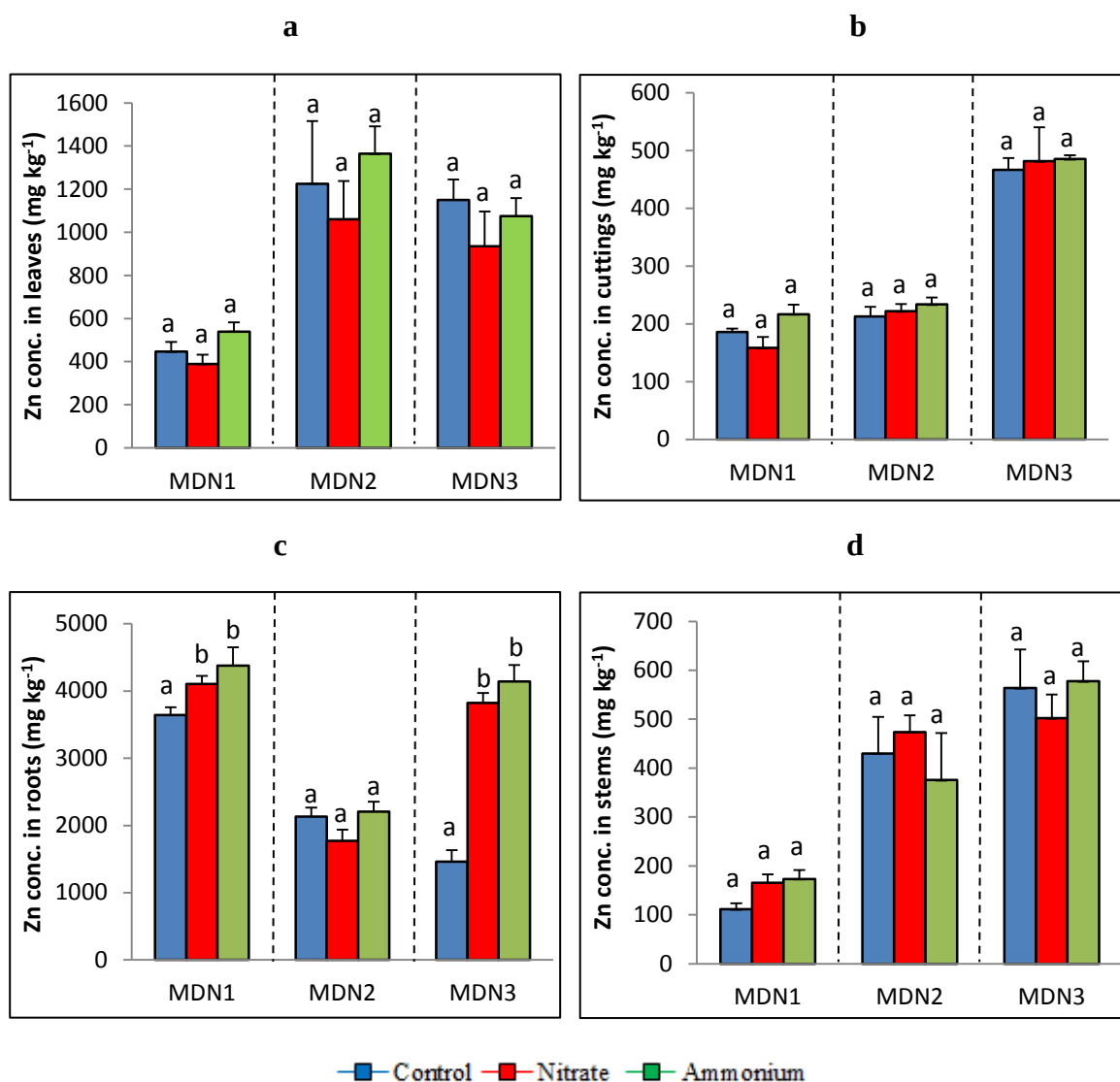


Figure 4.2.7: Effects of nitrogen nutrition on Zn concentrations in leaves (a), cuttings (b), roots (c) and stems (d) of *Populus euramericana* Dorkamp grown in a contaminated technosol during 35 days (n = 5), bars refer to standard error, letters indicate differences between treatment for a given soil.

The addition of N resulted in the highest Zn concentration in plant roots, whereas the untreated control had the minimum. In general, the poplar roots contained much higher concentrations of Zn than leaves in all studied samples, probably due to the preferential distribution of Zn in the roots.

Fig. 4.2.8A showed that N fertilization also did not affect the Pb concentration in plant leaves, which showed that for all studied samples, Pb concentrations were statistically at par with each other. In the other hand, N forms significantly affected Pb concentrations in both poplar cuttings and roots for MDN1 compared to the untreated control but not for MDN2 and MDN3 (Fig. 4.2.8B, 4.2.8C). In roots and shoots, the plants amended with NO_3^- and NH_4^+ in MDN1 had the highest Pb concentration compared to the untreated control. However, the Pb distribution between roots and leaves for MDN1 was significantly affected by N forms. In MDN1, the Pb distribution in the roots was maximum in the plants fed with NO_3^- and NH_4^+ , whilst it was minimum for the untreated control. On the other hand, in both MDN2 and MDN3, Pb concentrations were statistically at par with each other.

Addition of N fertilizers significantly affected the plant leaves Cd concentration in comparison to untreated control in MDN1. Only NH_4^+ exhibited the highest Cd concentration in MDN2, and no significant difference was observed for MDN3 (Fig. 4.2.9A). These findings are in consistent with that of Fageria and Baligar (2005), Diatta and Grzebisz (2006) which reported that acidification of the rhizosphere with NH_4^+ can enhance the plant metals uptake such as cadmium in soils. The same picture was observed in plant cuttings (Fig. 4.2.9B). Contrary to the Cd concentration in plant leaves and cuttings in MDN2, Cd concentration in roots was non-significantly affected by N forms (Fig. 4.2.9C). However, only NH_4^+ affected the plant roots Cd concentration in comparison to NO_3^- and untreated control. The concentration of both Pb and Cd in plant stems was not detected (under detection limit).

Little studies have been published on the PTE accumulation of poplars grown in real contaminated soils. Among different poplar species, the cultivar Dorskamp has demonstrate the largest metal concentrations in leaves when growing in a field containing a polymetallic pollution characterized by Pb, Cu, Zn and Cd concentrations 10 times higher than in a reference non contaminated soil (Pottier et al., 2015). It is well known that physicochemical properties of the soil such as pH and COD and the plant species are able to affect the PTE transfer to plant organs. Among them, pH is the most important factor which plays an important role in PTE mobility and availability. In the case of rhizospheric soil studies, several authors showed that under both field and glasshouse conditions, N supply could effectively affect plant metals uptake and metal translocation from root to shoot via the increasing or decreasing of pH value (Shi et al., 2010; Erenoglu et al., 2011).

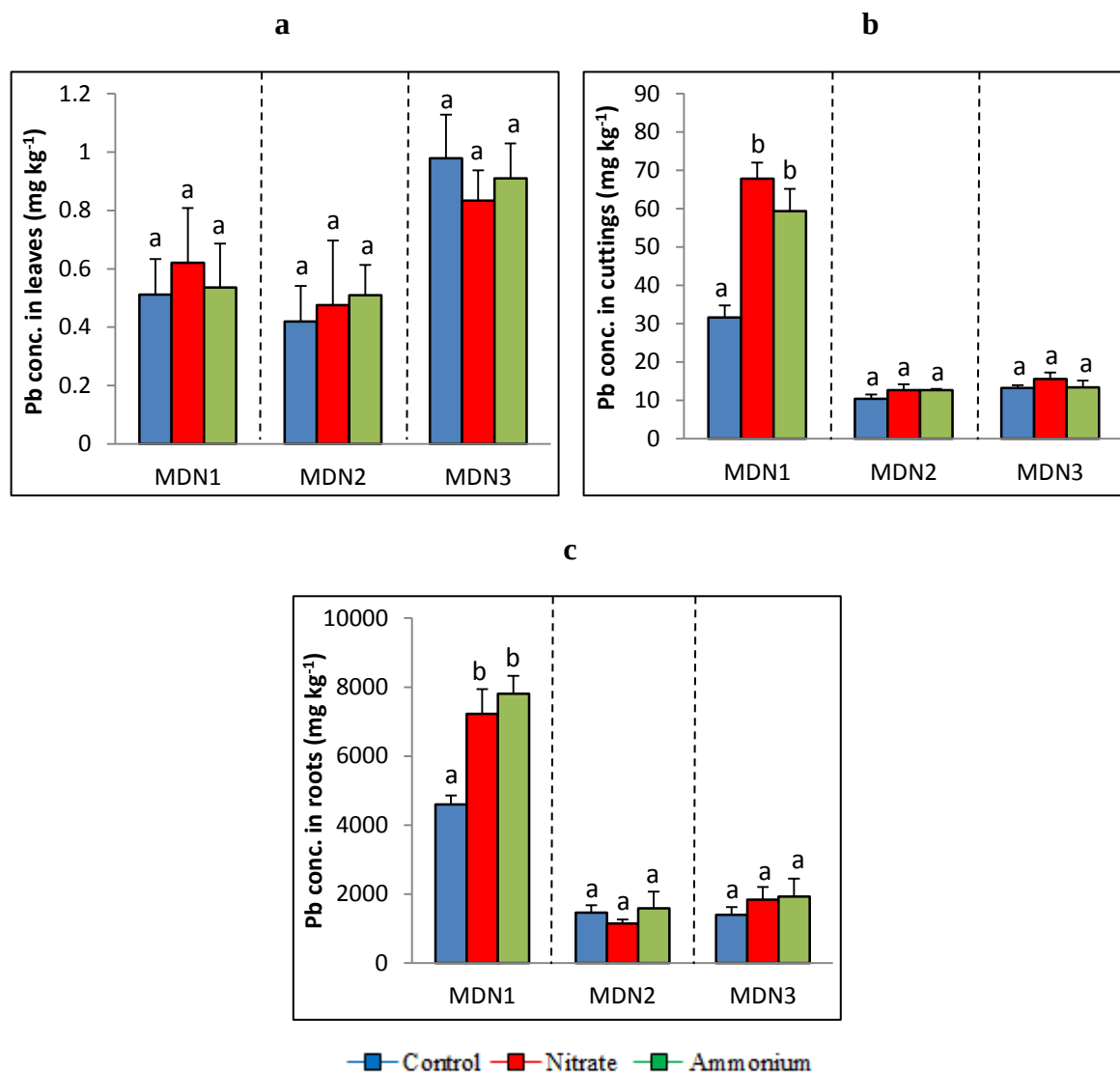


Figure 4.2.8: Effects of nitrogen nutrition on Pb concentrations in leaves (a), cuttings (b) and roots (c) of *Populus euramericana* Dorskamp grown in a contaminated technosol during 35 days (n = 5), bars refer to standard error, letters indicate differences between treatment for a given soil.

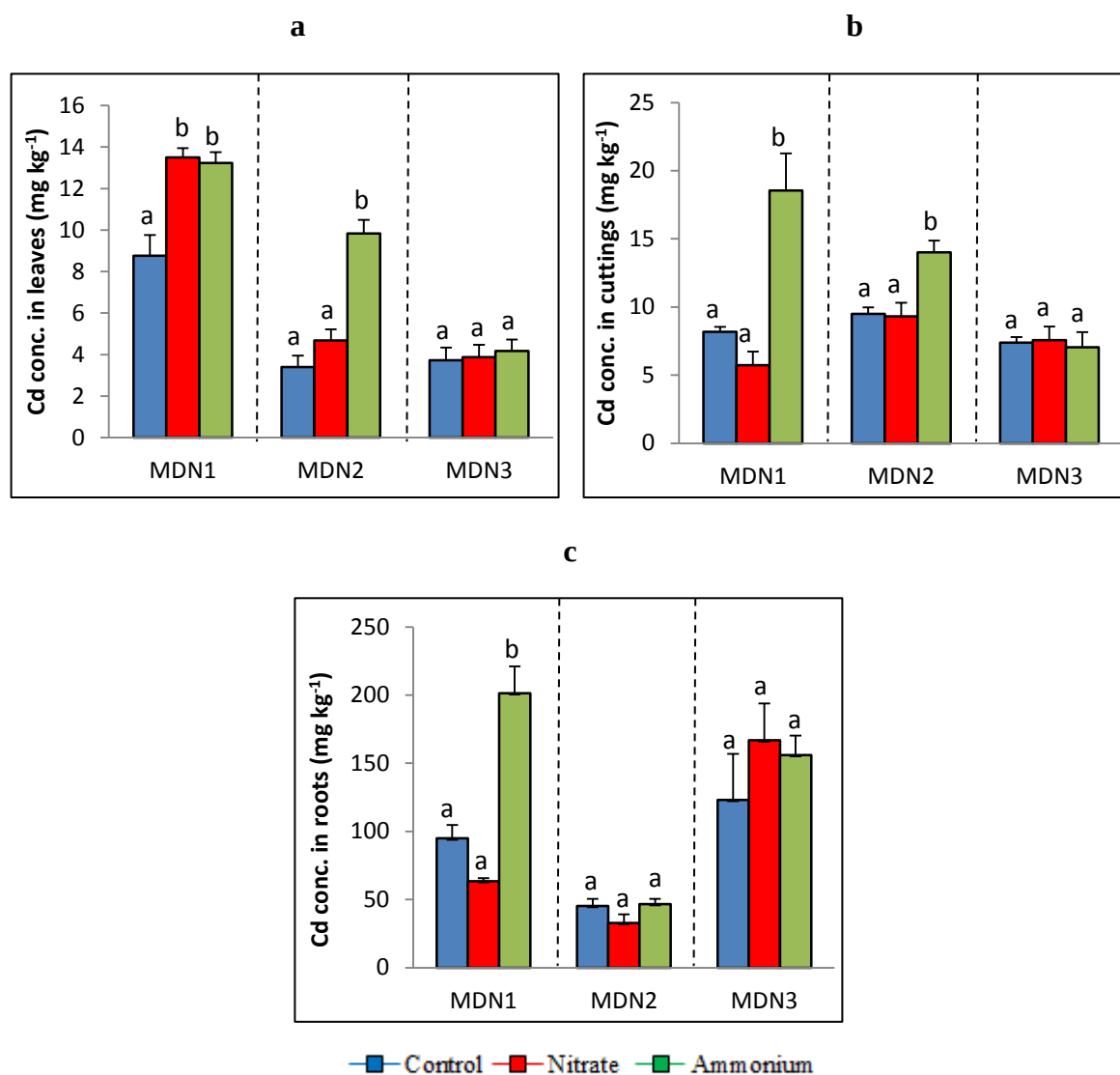


Figure 4.2.9: Effects of nitrogen nutrition on Cd concentrations in leaves (a), cuttings (b) and roots (c) of *Populus euramericana* Dorkamp grown in a contaminated technosol during 35 days (n = 5), bars refer to standard error, letters indicate differences between treatment for a given soil.

4. Conclusions

When N fertilizers respectively NH_4Cl and KNO_3 were supplied to *Populus euramericana* Dorkamp grown in soils contaminated with Zn, Pb, and Cd, rhizospheric SPW pH decreased and increased respectively for ammonium and nitrate significantly compared to the untreated control with time for all studied soils. DOC concentrations increased gradually and a significant difference between both nitrogen forms and untreated control was observed.

PTE total concentrations in the rhizospheric SPW increased with the addition of NH_4^+ , whilst it decreased with the addition of NO_3^- . No significant difference was observed in the shoot biomass between the two N forms and also the untreated control for all studied samples.

Despite the difference in SPW pH value caused by the addition of N fertilizers in comparison to the untreated control, metals uptake by *Populus euramericana* Dorskamp shoots is less dependent on enhanced metal solubility caused by rhizosphere acidification. PTE stabilization by *Populus euramericana* Dorskamp rhizosphere was thus found in the case of addition of nitrogen form and the potential of these species for the phytoremediation of contaminated technosol was shown.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Baghdad, Iraq) for the financial support, and are grateful to Florie Miard (Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures) for her excellent technical assistance.

References

- Barigah, T.S., Saugier, B., Mousseau, M., Guittet, J., Ceulemans, R., (1994) Photosynthesis, leaf area and productivity of 5 poplar clones during their establishment year. *Ann For Sci* 51:613–25
- Basta, N.T., McGowan, S.L., (2004) Evaluation of chemical immobilization treatments for reducing heavy metal transport in a smelter-contaminated soil. *Environ Pollut* 127:73–82
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., (2010) Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environ Pollut* 158:2282–2287
- Bolan, N.S., Duraisamy, V.P., (2003) Role of inorganic and organic soil amendments on immobilisation and phytoavailability of heavy metals: a review involving specific case studies. *Aust J Soil Res* 41: 533–555

- Bouman, O.T., Curtin, D., Campbell, C.A., Biederbeck, V.O., Ukrainetz, H., (1995) Soil acidification from long-term use of anhydrous ammonia and urea. *Soil Sci Soc Am J* 59:1488–1494
- Chaignon, V., Hinsinger, P., (2002) Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytol* 154:121–130
- Chigbo, C., Batty, L., Bartlett, R., (2013) Interactions of copper and pyrene on phytoremediation potential of *Brassica juncea* in copper–pyrene cocontaminated soil. *Chemosphere* 90:2542–2548
- Clemente, R., Bernal, M.P., (2006) Fractionation of heavy metals and distribution of organic carbon in two contaminated soils amended with humic acids. *Chemosphere* 64:1264–1273
- Cory, R., Green, S., Pregitzer, K., (2004) Dissolved organic matter concentration and composition in the forests and streams of Olympic National Park, WA. *Biogeochemistry* 67:269–288.
- Curtis, P.S., Vogel, C.S., Pregitzer, K.S., Zak, D.R., Teeri, J.T., (1995) Interacting effects of soil fertility and atmospheric CO₂ on leaf area growth and carbon gain physiology in *populus*. *New phytol* 129:253–263
- Darrah, P.R., Jones, D.L., Kirk, G.J.D., Roose, T., (2006) Modelling the rhizosphere: a review of methods for ‘upscaling’ to the whole-plant scale. *Eur J Soil Sci* 57:13–25
- Diatla, J.B., Grzebisz, W., (2006) Influence of mineral nitrogen forms on heavy metals mobility in two soils. Part I. *Pol J Environ Stud* 15:56–62
- Erenoglu, E.B., Kutman, U.B., Ceylan, Y., Yildiz, B., Cakmak, I., (2011) Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root-to-shoot translocation and remobilization of zinc (65Zn) in wheat. *New Phytol* 189:438–448
- Fageria NK, Baligar VC (2005) Enhancing nitrogen use efficiency in crop plant. *Adv Agron* 88:97–185
- Hartley, W., Dickinson Riby, P., Elizabeth Leese, E., Morton, J., Lepp, N.W., (2010) Arsenic mobility and speciation in a contaminated urban soil are affected by different methods of green waste compost application. *Environ Pollut* 158:3560–3570
- Hattab, N., Soubrand, M., Guégan, R., Motelica-Heino, M., Bourrat, X., Faure, O., Bouchardon, J.L., (2014b) Effect of organic amendments on the mobility of trace elements in phytoremediated technosols: role of the humic substances. *Environ Sci Pollut Res* 21:10470–10480

- Hattab, N., Motelica-Heino, M., Bourrat, X., Mench, M., (2014a) Mobility and phytoavailability of Cu, Cr, Zn, and As in a contaminated soil at a wood preservation site after four years of aided phytostabilization. *Environ Sci Pollut Res* 21:10307-10319\
- Haynes, R.J., (1990) Active ion uptake and maintenance of cation–anion balance. A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant Soil* 126:247–264
- Hinsinger, P., (2001) Bioavailability of trace elements as related to root introduced chemical changes in the rhizosphere. In: Gobran GR, Wenzel WW, Lombi E. (Eds.). *Trace elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington DC, p 25–41
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., (2009) Rhizosphere: bio-physics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* 321:117–152
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B., (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248:43–59
- Jamali, M.K., Kazi, T.G., Arain, M.B., Afridi, H.I., Jalbani, N., Kandhro, G.A., Shah, A.Q., Baig, J.A., (2009) Heavy metal accumulation in different varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in soil amended with domestic sewage sludge. *J Hazard Mater* 164:1386–1391
- Kaiser C, Koranda M, Kitzler B, Fuchslueger L, et al. (2010) Below-ground carbon allocation by trees drive seasonal pattern of extracellular enzyme activities by altering microbial community composition in a beech forest soil. *New Phytol* 187:843–858
- Kalbitz K, Solinger S, Park JH, Michalzik B, Matzner E (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci.* 165: 277–304
- Kim KR, Owens G, Kwon, SK (2010a) Influence of Indian mustard (*Brassica juncea*) on rhizosphere soil solution chemistry in long-term contaminated soils: A rhizobox study. *J Environ Sci* 22:98–105
- Knight B, Zhao FJ, McGrath SP, Shen ZG (1997) Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant and Soil* 197:71-78
- Komarnicki GJK (2005) Lead and cadmium in indoor air and the urban environment. *Environ Pollut* 135:47–61

- Kraus TH, Warren SL (2002) Nitrogen form affects growth, mineral content, and root anatomy of *Cotoneaster* and *Rudbeckia*. *Hort Sci* 37:126–129
- Kumpiene J, Lagerkvist A, Maurice C (2008) Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments: a review. *Waste Management* 28:215–225
- Kumpiene J, Ore S, Renella G, Mench M, Lagerkvist A, Maurice C (2006) Assessment of zerovalent iron for stabilization of chromium, copper, and arsenic in soil. *Environ Pollut* 144:62-69
- Lakzian A, Darbar SR, Haghnia GH, Hallajnia A (2010) Elevated CO₂ and nitrogen effects on dissolved organic carbon of two calcareous and non-calcareous soils. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, Brisbane, Australia
- Lombi E, Wenzel WW, Goran GR, Adriano DC (2001) Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: a review. In: Gobran GR, Wenzel WW, Lombi E (Eds.). *Trace elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington DC, p 4-23
- Luo YM, Yan WD, Christie P (2001) Soil solution dynamics of Cu and Zn in a Cu and Zn polluted soil as influenced by γ -irradiation and Cu-Zn interaction. *Chemosphere* 42:179-184
- Marschner H (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. London, UK, Academic Press, P 889
- Marschner H, and Romheld V (1996) Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. In *Plant Roots. The Hidden Half*, 2nd ed. YWaisel, A Eshel and U Kafkafi. Marcel Dekker, New York, p 557–579
- McDowell, WH, Magill AH, Aitkenhead-Peterson, JA, Aber JD, Merriam JL, Kaushal SS (2004) Effects of chronic nitrogen amendment on dissolved organic matter and inorganic nitrogen in soil solution. *Forest Ecol Manag* 196:29–41
- Mench M, Manceau A, Vangronsveld J, Clijsters H, Mocquot B (2000) Capacity of soil amendments in lowering the phytoavailability of sludge-borne zinc. *Agronomie* 20:383-397
- Monsant AC, Tang C, Baker AJM (2008) The effect of nitrogen form on rhizosphere soil pH and zinc phytoextraction by *Thlaspi caerulescens*. *Chemosphere* 73:635–642
- Norton JM, Firestone MK (1996) N dynamics in the rhizosphere of *Pinus ponderosa* seedlings. *Soil Biol Biochem* 28:351–362

- Nyamangara J (1998) Use of sequential extraction to evaluate zinc and copper in a soil amended with sewage sludge and inorganic metal salts. *Agri Ecosyst Environ* 69:135–141
- Nye PH (1981) Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant Soil* 61:7–26
- Pandey J, Chauhan A, Jain RK (2009) Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *FEMS Microbiol Rev* 33:324–375
- Park JH, Kalbitz K, Matzner E (2002) Resource control on the production of dissolved organic carbon and nitrogen in a deciduous forest floor. *Soil Biol Bio* 34:813–822
- Phillips LA, Greer CW, Farrell RE, Germida JJ (2012) Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. *Appl Soil Ecol* 52:56–64
- Pinto AP, Mota AM, Varesme AD, Pinto FC (2004) Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci Total Environ* 326:239–247
- Pottier M, García de la Torre VS, Victor C, David LC, Chalot M, Thomine S (2015) Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environ Pollut* 199:73–82
- Pregitzer KS, Zak DR, Burton AJ, Ashby JA, MacDonald NW (2004) Chronic nitrate additions dramatically increase the export of carbon and nitrogen from northern hardwood ecosystems. *Biogeochemistry* 68:179–197
- Priha O, Hallantie T, Smolander A (1999) Comparing microbial biomass, denitrification enzyme activity, and numbers of nitrifiers in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings by microscale methods. *Biol Fert Soils* 30: 14–19
- Qasim B and Motelica-Heino M (2014) Potentially toxic element fractionation in technosols using two sequential extraction schemes. *Environ Sci Pollut Res* 21:5054 – 5065
- Raicevic S, Kaludjerovic-Radoicic T, Zouboulis AI (2005) In situ stabilization of toxic metals in polluted soils using phosphates: theoretical prediction and experimental verification. *J Hazard Mater* 117:41–53
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganism. *Plant Soil* 321: 305–339
- Ross SM (1994) *Toxic Metals in Soil Plant Systems*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

- Rovira AD, Foster RC, Martin JK (1979) Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: Harley, J.L., Russell, R.S. (Eds.), *The Soil–Root Interface*. Academic Press, London, p 1–4
- Ruan J, Gerendás J, Härdter R, Sattelmacher B (2007) Effect of Nitrogen Form and Root-zone pH on Growth and Nitrogen Uptake of Tea (*Camellia sinensis*) Plants. *Ann Bot* 99:301–310
- Ruan J, Zhang F, Wong MH (2000) Effect of nitrogen form and phosphorus source on growth, nutrient uptake and rhizosphere property of *Camellia sinensis* L. *Plant Soil* 223:65–73
- Ruan JY, Ma LF, Shi YZ, Zhang FS (2004) Effect of litter incorporation and nitrogen fertilization on the contents of extractable aluminum in the rhizosphere soil of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Plant and Soil* 263:283–296
- Sabir M, Hanafi MM, Malik MT, Aziz T, Rehman MZ, Ahmad HR, Hakeem KR, Shahid M (2013) Differential effect of nitrogen forms on physiological parameters and micronutrient concentration in maize (*Zea mays* L.). *Aust J Crop Sci* 7:1836-1842
- Sauvé S, McBride MB, Hendershot W (1998) Soil solution speciation of lead (II): Effects of organic matter and pH. *Soil Sci Soc Am J* 62:618–621
- Scheuner ET, Makeschin F (2005) Impact of atmospheric nitrogen deposition on carbon dynamics in two scots pine forest soils of northern Germany. *Plant Soil* 275:43–54
- Shi RL, Zhang YQ, Chen XP, Sun QP, Zhang FS, Römheld V, Zou CQ (2010) Influence of long-term nitrogen fertilization on micronutrient density in grain of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Cereal Sci* 51:165–170
- Silber A, Yones LB, Dori L (2004) Rhizosphere pH as a result of nitrogen levels and NH_4/NO_3 ratio and its effect on zinc availability and on the growth of rice flower (*Ozothamnus diosmifolius*). *Plant Soil* 262: 205-213
- Sitaula BK, Bajracharya RM, Singh BR, Solberg B (2004) Factors affecting organic dynamics in soil of Nepal/Himalayan region; a review and analysis. *Nutr Cycling Agroecosyst* 70:215-229
- Tachibana N, Yoshikawa S, Ikeda K (1995) Influences of heavy application of nitrogen on soil acidification and root growth in tea fields. *Japanese J Crop Sci* 64:516–522
- Tang C, Rengel Z (2003) Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification. In: Rengel Z, (Ed.), *Handbook of Soil Acidity*. Marcel Dekker, New York, p 57– 81

- Tao S, Chen FL, Xu J, Cao B, Li G (2003) Changes of copper speciation in maize rhizosphere soil. *Environ Pollut* 122:447-454
- Taylor AR, Bloom AJ (1998) Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. *Plant Cell Environ* 21:1255–1263
- Thiry M, van Oort F (1999) Les phases minérales majeures et mineures d'une friche industrielle de métallurgie des métaux non ferreux: état d'altération, évolution géochimique et devenir des métaux polluants du site de Mortagne-du-Nord, In: Les cahiers des clubs CRIN, acte du colloque 'La Spéciation des Métaux dans le Sol'. Association ECRIN Paris pp. 108–159
- Weintraub MN, Scott-Denton LE, Schmidt SK, Monson RK (2007) The effects of tree rhizodeposition on soil exoenzyme activity, dissolved organic carbon, and nutrient availability in a subalpine forest ecosystem. *Oecologia* 154:327–338
- Zhou Y, Zhang Y, Wang X, Cui J, Xia X, Shi K, Yu J (2011) Effects of nitrogen form on growth, CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plant. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 12:126–134
- Zhu X, Ni X, Liu J, Gao Y (2014) Application of endophytic bacteria to reduce persistent organic pollutants contamination in plants. *Clean-Soil Air Water* 42:306–310

Conclusions générales et perspectives

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion générale

La contamination par les éléments traces métalliques (ETM) a été considérée comme une menace très importante sur l'environnement (sol, eau et l'air) selon la Commission Européenne. Dans un contexte d'évaluation des risques écologiques des anciens sites miniers et industriels, mais aussi de gestion des milieux naturels, il est capital d'acquérir des connaissances sur le devenir des ETM dans les différents compartiments abiotiques et biotiques des sols contaminés et de définir les mécanismes qui conditionnent leur transfert, leur capacité de bioaccumulation et, *in fine*, leurs effets toxiques et écotoxicologiques sur les différents niveaux biologiques d'intégration (De Kimpe et Morel 2000; Morel et Heinrich 2006). Le développement de végétaux peut en effet décontaminer le sol mais peut également aboutir, de façon transitoire ou permanente, soit à une spéciation des ETM dans le sol plus sensible à des processus de remobilisation, soit à une augmentation des doses reçues par des animaux (e.g. invertébrés détritivores). En particulier le sol rhizosphérique, à savoir les quelques millimètres de sol entourant les racines des plantes, est influencé par leur activité biologique ; c'est en effet un système très dynamique caractérisé par des boucles de rétroaction entre les caractéristiques du sol, les processus racinaires et la dynamique de la population microbienne associée. La rhizosphère correspond en effet à un microenvironnement géochimique influencé par l'activité des plantes (exsudats racinaires composés d'acides organiques et de sidérophores, respiration etc.) et des microorganismes (minéralisation de la matière organique etc.). Cette activité influence très localement l'écodynamique des ETM, directement (précipitation, complexation, absorption des ETM) et indirectement (effets rhizosphériques sur le pH et le potentiel redox, dissolution de minéraux etc.). L'étude de l'influence des processus rhizosphériques sur la mobilité, la disponibilité et la toxicité des ETM est donc un enjeu majeur pour comprendre l'écodynamique des ETM en contexte de phytoremédiation ou d'atténuation naturelle des sols contaminés.

Au cours de ces dernières années, la politique de gestion des sols et des sites miniers ou industriels pollués s'est principalement focalisée sur l'étude de l'évaluation de la spéciation chimique, la mobilité et la phytodisponibilité des ETM afin de prévoir leur impact et leur toxicité sur l'environnement. Ainsi, leur éventuel transfert à la végétation (biodisponibilité) ou d'éventuelles dispersions dans l'environnement pourraient être mieux gérés et limités. Sur

ce dernier point, le concept de biodisponibilité est relativement complexe et traduit un processus dynamique (Peijnenburg et al. 1997) faisant intervenir deux notions distinctes : la stabilité des équilibres thermodynamiques des métaux à l'interface liquide/solide (également qualifiée de «disponibilité environnementale») et les processus physiologiques d'absorption par les organismes cibles (également qualifiés de «biodisponibilité environnementale»). Une évaluation précise de la biodisponibilité doit donc à la fois tenir compte des possibilités de désorption physico-chimique des ETM et des récepteurs biologiques qu'ils pourront atteindre.

Pour cela, l'objectif de notre travail s'inscrit dans cette thématique et propose une analyse des méthodologies expérimentales, à travers une détermination de la concentration totale des ETM (Zn, Pb, Cd, As et Sb) présents dans deux technosols contaminés issus de sites post-minier et post-industriels ; nous nous sommes ensuite intéressé à la spéciation chimique, la mobilité, la phytodisponibilité et l'effet rhizosphérique sur le comportement de ces éléments. L'objectif final est de mettre en évidence le rôle de la rhizosphère sur la dynamique des éléments métalliques et métalloïdes dans un contexte de phytostabilisation de technosols contaminés.

Les sites d'étude présentent une tendance à être fortement enrichis en éléments potentiellement toxiques. Les concentrations totales en ETM ont montré que dans les échantillons du site MDN, l'ordre d'abondance des ETM étudiés dans les trois zones d'étude est : $Zn > Pb > Cd$, tandis que l'ordre d'abondance dans les trois emplacements du site LPF est : $As > Pb > Sb$. Par conséquent les échantillons sélectionnés pour cette étude sont caractérisés par des paramètres physico-chimiques différents (e.g. pH, EC et TOC) avec la présence de concentrations élevées de métaux dans ces échantillons.

La première étude réalisée sur ces échantillons a pour objectif d'étudier la spéciation chimique et le fractionnement des ETM à l'aide de deux techniques d'extraction séquentielle (schéma de Tessier et schéma de BCR modifié).

Nos résultats montrent que dans les échantillons du site de MDN, les métaux Zn, Pb et Cd sont principalement associés aux fractions acide soluble et réductible, indiquant que ces métaux ont la plus grande affinité pour ces fractions, ce qui signifie qu'ils peuvent être considérés comme les éléments les plus mobiles et potentiellement disponibles dans la biosphère, représentant donc un risque environnemental plus important. Pour les échantillons du site de LPF, les résultats ont montré que l'As, Pb et Sb sont relativement stables puisqu'ils constituent principalement l'étape 5 et 4 de l'extraction séquentielle et reflètent donc la plus grande affinité de ces métaux dans la fraction résiduelle (matrices de silicates cristallins) indépendamment du type de matrice solide et sont considérés comme moins mobiles par rapport aux métaux du site de MDN.

Des variations systématiques concernant la fraction " réductible " ont été observées, i.e. la teneur en métaux et métalloïdes dans les fractions réductibles obtenues par la procédure de Tessier était, en général, plus élevée que celle obtenue par le schéma BCR modifié. Ceci peut être attribué aux conditions fortes qui sont utilisées dans le schéma de Tessier pour extraire cette fraction. Cela montre que les fractions ne sont définies que de manière opérationnelle et ne sont pas totalement exclusives à la phase minérale spécifiée. En revanche, les pourcentages de métaux extraits de la fraction organique par le schéma BCR modifié étaient toujours supérieurs à ceux obtenus par le schéma de Tessier.

On peut dire que l'extraction séquentielle suivie dans cette étude est utile pour étudier la spéciation chimique et le fractionnement des métaux et métalloïdes dans les échantillons de technosols des deux sites étudiés.

La deuxième étude réalisée au cours de cette thèse a eu pour objectif d'évaluer la mobilité et la phytodisponibilité de métaux et métalloïdes sur les mêmes échantillons variant dans leur degré de contamination, en utilisant cinq procédures d'extraction sélectives (e.g. extraction simple) différentes : 0.01M CaCl_2 , 0.1M NaNO_3 , 1M NH_4NO_3 , 0.05M EDTA et DTPA-TEA- CaCl_2 , avec un test de germination en utilisant des espèces d'essai sélectionnées (*Phaseolus vulgaris* L.).

Les résultats que nous avons obtenus ont montré que la capacité d'extraction des métaux et métalloïdes étudiés par les extracteurs a suivi l'ordre : EDTA > DTPA > NH_4NO_3 > CaCl_2 > NaNO_3 pour l'ensemble des échantillons des deux sites. L'EDTA a pu extraire les concentrations les plus élevées des métaux et métalloïdes (Zn, Pb, Cd, As et Sb), par rapport à l'autre extracteur. En outre, les solutions de sel neutre (CaCl_2 , NH_4NO_3 et NaNO_3) ont extrait des concentrations inférieures à celles extraites par rapport à l'agent complexant (EDTA et DTPA). Dans certains types de sols, nous avons trouvé que la solution de CaCl_2 a pu extraire des quantités plus élevées de Zn et aussi de Cd que la solution de NH_4NO_3 , ce qui pourrait être dû au fait que le cation divalent Ca^{2+} peut les extraire plus facilement que les cations monovalents tels que Na^+ et NH_4^+ . Par rapport à toutes les solutions d'extraction utilisées, l'efficacité d'extraction la plus faible des métaux et métalloïdes a été obtenue avec la solution de NaNO_3 .

L'analyse statistique a montré une faible corrélation entre les concentrations des métaux et métalloïdes dans les feuilles de haricots nains et les concentrations extraites par l'EDTA et aussi par le DTPA. Contrairement aux résultats statistiques obtenus à partir de l'EDTA et DTPA, l'analyse statistique a montré une corrélation positive significative entre les concentrations des métaux et métalloïdes dans les feuilles de haricots et les concentrations extraites par CaCl_2 et les solutions de nitrate.

Dans la littérature, plusieurs études ont montré que l'EDTA et le DTPA ont été utilisés pour évaluer la phytodisponibilité de nombreux métaux (e.g. Cd, Zn et Ni) ce qui est bien corrélé avec leurs concentrations dans les plantes (Gupta and Aten 1993; Cajuste et al. 2000; Simmons and Pongsakul, 2004). Cette contradiction dans l'efficacité rapportée des agents complexants pourrait être causée par des différences dans le contenu de la matière organique des sols, le pH du sol, la teneur en métaux et métalloïdes, la source et la forme du contaminant dans les sols, et aussi l'âge du contaminant et la pédogenèse.

Nos résultats montrent que les solutions de sels neutres (en particulier la solution de 0,01M CaCl_2) étaient plus efficaces pour estimer la phytodisponibilité des métaux que les solutions des agents complexants (EDTA et DTPA) les plus agressifs, car les sels neutres retiraient les métaux de la phase solide du sol par saturation avec le cation de désorption situé à la surface minérale. Enfin, et selon la littérature, il semble qu'il n'y a pas un accord général pour lequel la solution de sel neutre soit la plus efficace pour estimer la phytodisponibilité des métaux, mais la solution de 0.01M CaCl_2 reste la plus largement préconisée dans de nombreux pays, en Europe, aux États-Unis et en Australie.

On s'est ensuite intéressé à l'efficacité de la technique du gradient diffusif en couche mince (*Diffusive Gradients in Thin films* (DGT)) sur la solution de sol (*Soil Pore Water* (SPW)) pour évaluer la phytodisponibilité et la remobilisation potentielle des métaux à l'aide du test d'exposition, qui consiste à cultiver des haricots nains sur les échantillons de sols en pots. Les concentrations des métaux mesurés par DGT sont désignées comme des concentrations labiles (pool labile) qui comprennent la fraction dissoute des métaux disponibles pour l'absorption par le biota.

Dans notre étude, nous montrons que comme les plantes, le dispositif de DGT abaisse localement la concentration des métaux dans l'eau interstitielle en adsorbant les métaux dans la résine et reproduit ainsi l'action du système racinaire d'une plante. Une corrélation positive significative entre les concentrations des métaux dans l'eau interstitielle du sol et leurs concentrations mesurées par la DGT a été trouvée pour nos échantillons de sols de nature et concentration très différentes au niveau de la contamination métallique.

De bonnes corrélations ont également été trouvées entre les concentrations des métaux dans l'eau interstitielle du sol, leurs concentrations mesurées par la DGT et l'accumulation des métaux dans les feuilles de haricot nain. Ceci implique que les concentrations des métaux mesurés par le dispositif DGT pourraient être utilisées comme substitut pour l'absorption des métaux par les plantes, même pour des métaux ayant une chimie aussi complexe que ceux étudiés dans ce travail. Nous pouvons donc affirmer que la technique DGT et l'eau

interstitielle du sol sont capables de fournir des informations pertinentes sur la biodisponibilité des métaux dans le sol contaminé.

En complément de nos mesures expérimentales, une étude complémentaire a recherché, en système de culture de type rhizobox, l'effet rhizosphérique de la croissance de *Populus euramericana* Dorskamp sur la mobilité des métaux (Zn, Pb et Cd) dans le technosol de MDN. Il s'agissait d'étudier l'effet rhizosphérique sur le pH, les concentrations de carbone organique dissout (COD) et les concentrations des métaux dans l'eau interstitielle du sol par rapport aux sols totaux et également sur l'absorption de ces métaux par les plants de peupliers.

Les résultats ont montré que le pH de l'eau interstitielle du sol a augmenté de 0.3 à 0.6 unités par rapport à l'ensemble des sols étudiés. Une augmentation significative a également été observée pour les concentrations de COD, indépendamment du type de sol ou des concentrations totales de ces métaux, ce qui pourrait être attribué à l'activité des racines des plantes. Dans tous les sols étudiés, les concentrations de métaux dans l'eau interstitielle du sol ont diminué de façon significative après la croissance des plants par rapport aux sols totaux, ce qui pourrait être attribué à l'augmentation du pH et les effets des exsudats racinaires.

L'accumulation des métaux a été trouvée dans tous les organes des peupliers et les concentrations de métaux les plus élevées ont été trouvées dans les racines par rapport à la partie aérienne. Les concentrations des métaux dans l'eau interstitielle de sol de la rhizosphère ont été considérablement influencées par le pH et le COD, qui à leur tour, ont été influencés par la croissance des plantes et les effets rhizosphériques. L'augmentation du pH et du DOC interagissent de manière antagoniste en ce qui concerne la diminution des concentrations de métaux dans l'eau interstitielle de sol. L'effet de l'augmentation du pH a été plus important que celle de l'augmentation de COD, ce qui a induit une diminution globale des concentrations de métaux dissous dans ces sols. Les changements dans les concentrations et les espèces de métaux dissous ont fortement influencé l'absorption des métaux par les plantes. L'absorption des métaux par les plantes est principalement liée aux concentrations des métaux dans l'eau interstitielle de sol plutôt qu'aux concentrations totales de métaux dans les sols. On peut dire que le transfert limité des métaux étudiés à la partie aérienne de *Populus euramericana* Dorskamp confirme le rôle potentiel de cette espèce dans l'immobilisation de ces métaux.

Finalement, nous nous sommes intéressés à l'effet de la fertilisation en azote (sous forme de nitrate et d'ammonium) sur la phytostabilisation du Zn, Pb et Cd en utilisant des plants de *Populus euramericana* Dorskamp cultivés en conditions contrôlées au laboratoire. Il s'agit d'étudier et de comparer l'effet temporel de deux fertilisations azotées (nitrate et ammonium)

sur le pH, les concentrations de carbone organique dissoute (COD) et les concentrations des métaux dans l'eau interstitielle du sol, et dans les différents organes de la plante étudiée.

Nos résultats ont montré que l'addition de NH_4^+ et de NO_3^- a un effet significatif sur l'augmentation et la diminution du pH de l'eau interstitielle rhizosphérique, alors que le pH des sols témoins non traités a légèrement diminué initialement et ensuite augmenté à la fin de l'expérience. Pour tous les échantillons, les concentrations de COD ont augmenté avec le temps par rapport aux valeurs initiales. De plus, l'addition d' NH_4^+ a été plus efficace que celle de NO_3^- pour générer cette augmentation de COD.

Les concentrations de métaux dans l'eau interstitielle rhizosphérique ont été augmentées avec l'addition de NH_4^+ , tandis qu'elles ont été diminuées avec l'addition de NO_3^- en présence ou en absence de peupliers. L'addition de la fertilisation en azote n'a eu aucune influence significative sur la croissance, la surface totale et la biomasse des feuilles de *Populus euramericana* Dorskamp par rapport aux échantillons témoins non traités.

Dans cette étude, les concentrations des métaux accumulés dans les racines ont été les plus élevées par rapport à la partie aérienne des plantes, ce qui indique que l'extraction des métaux par les plantes n'a pas été améliorée par l'application d'azote dans tous les échantillons étudiés, malgré la différence de valeur de pH de l'eau interstitielle rhizosphérique qui a été provoquée par l'addition de fertilisants azotés par rapport aux sols témoins non traités.

Nous arrivons à la conclusion que l'addition de NH_4^+ et de NO_3^- a été efficace pour la phytostabilisation des métaux dans les technosols contaminés par *Populus euramericana* Dorskamp.

2. Perspectives

Dans ce travail de thèse, nous avons contribué à l'étude de l'écodynamique de quelques éléments traces métalliques et à l'évaluation de l'effet rhizosphérique sur le comportement de ces métaux. Les travaux effectués au cours de cette thèse souffrent de quelques limitations qui alimentent les perspectives envisagées :

- Il pourrait être intéressant de mettre en évidence que les résultats obtenus par les schémas d'extraction séquentielle dépendent non seulement des types de réactifs utilisés et des conditions opératoires pour extraire chaque phase, mais également de la nature du métal ou du métalloïde et de la matrice à partir de laquelle le métal(loïde) est extrait. De plus, pour éviter les incertitudes dans l'interprétation des données de partitionnement des métaux traces acquises grâce à l'utilisation de deux schémas

individuels, il devrait y avoir plus d'investigations chimiques et minéralogiques sur l'application de schémas d'extraction séquentielle sur les échantillons de technosols, ainsi que d'appliquer ces schémas d'extraction aux sols rhizosphériques.

- Pour modéliser le potentiel de la phytostabilisation, la recherche future doit se focaliser sur les relations empiriques entre l'accumulation du métal ou du métalloïde par les plantes sur le terrain et les méthodes standardisées rapides de laboratoire tels que le bio-essai *P. vulgaris* ou le procédé d'extraction unique de CaCl_2 proposé dans la présente étude. De plus, d'après nos résultats, la procédure d'extraction par 0,01M CaCl_2 semble d'être le procédé convenable pour estimer la phytodisponibilité des métaux traces étudiés dans les technosols, puisque cette procédure présente une capacité d'extraction appropriée pour ce type d'études et utilise également une concentration en sel plus faible ; nous conseillons d'adopter une procédure unique pour la détermination de la disponibilité pour les plantes. Ce serait la première étape vers l'harmonisation de ces procédures afin d'obtenir des données comparables entre laboratoires.
- Il devrait y avoir une investigation plus approfondie pour voir si la méthodologie des capteurs DGT est un outil approprié pour prédire la disponibilité des métaux traces et leur phytodisponibilité et aurait une valeur supplémentaire dans la prédiction de la biodisponibilité de métaux par rapport aux méthodes classiques d'extraction chimique. Pour cela, nous conseillons donc de tester cette méthodologie sur un nombre de données plus important, pour une gamme de conditions de contamination en métaux et métalloïdes et des propriétés du sol différentes ainsi que différentes espèces végétales.
- Sur le site de MDN, nous avons étudié l'effet de l'addition d'azote sur le comportement des éléments traces métalliques dans le sol rhizosphérique de jeunes plants de peupliers en rhizobox. Les résultats présentés dans ce travail ont été obtenus après cinq semaines d'expérimentation. Nous conseillons donc de refaire des expériences à long terme pour surveiller et évaluer l'effet de l'azote ajouté au sol ainsi que d'appliquer ce travail *in situ*.
- Nous recommandons aussi d'étudier les mécanismes réactionnels dans le sol rhizosphérique et sa solution et leurs conséquences pour les voies d'exposition et les impacts sur les cibles. Il serait également intéressant de déterminer le devenir (spéciation, concentration, pools labile et non-labile) des ETM dans des sources d'exposition (sol rhizosphérique et solution de sol), les effets sur des végétaux dans des bio-tests et sur des espèces biologiques accumulatrices d'ETM.

- Mettre en évidence le rôle de la rhizosphère sur la dynamique des éléments métalliques et métalloïdes dans un contexte de phytostabilisation assistée de sols et technosols contaminés.

Cet objectif sera atteint à travers :

- l'étude de la microflore rhizosphérique,
 - l'identification moléculaire des exsudats racinaires,
 - l'étude de la transformation de ces exsudats par la microflore rhizosphérique,
 - la mise en évidence de l'influence de ces facteurs biogéochimiques sur la spéciation, la mobilité et la phytodisponibilité des éléments inorganiques dominants.
- Enfin une modélisation géochimique doit être réalisée pour étudier le comportement des EM dans le système rhizosphérique.

Références bibliographiques

- Adriano, D.C., (2001) Trace elements in terrestrial environments, Biogeochemistry, bioavailability and risk of metals. 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin.
- Adriano, D.C., (1986) Trace elements in terrestrial environment; Springer Verlage, New York.
- Algreen M., Trapp S., Rein A. (2013) Phytoscreening and phytoextraction of heavy metals at Danish polluted sites using willow and poplar trees. *Environ Sci Pollut Res.* 21, 8992-9001.
- Alloway, B.J., (1995) Heavy metals in soils. Chapman & Hall, London. p. 368.
- Alma's, A.R., Lombnas, P., Sogn, T.A., Mulder, J., (2006) Speciation of Cd and Zn in contaminated soils assessed by DGT-DIFS, and WHAM/Model VI in relation to uptake of spinach and ryegrass. *Chemosphere*, 62, 1647–1655.
- Andreux, F., (1997) La matière organique des sols: interactions avec les polluants. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 83, pp. 111-123.
- Arabinda, K.S., Ruma, C., Cervera, L.M., Miguel, G., (1995) Metal speciation in solid matrices. *Talanta*, 42, 1007-1030.
- Badawy, S. H., Helal, M.I.D., Chaudri, A.M., Lawlor, K. & McGrath, S.P., (2002) Soil solid-phase controls lead activity in soil solution. *J. Environ. Qual.* 31, 162-167.
- Baffi, C., Bettinelli, M., Beone, G.M., Spezia, S., (2002) Comparison of different analytical procedures in the determination of trace elements in lichens. *Chemosphere*, 48, 299 - 306.
- Baize, D., & Girard, M.C., (1995) *Référentiel Pédologique*. INRA, Paris. p.332.
- Baize, D., (1997) *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France)*. INRA Editions, Paris, pp. 408.
- Baize, D., Jabiol, B., (1995) *Guide pour la description des sols*. Paris, INRA Editions.
- Baize, D., Tercé, M., (2002) *Les Éléments Traces Métalliques dans les Sols – Approches Fonctionnelles et Spatiales*, INRA Éditions, Paris, France. pp. 570.
- Beauchamp, J., (2003) *Propriétés des sols*, Université de Picardie Jules Verne, <http://www.u-picardie.fr/beauchamp/mst/sol.htm>.
- Belzile, N., Lecomte, P., Tessier, A., (1989) Testing readsorption of Trace elements during partial chemical extractions of bottom sediments. *Environmental Science and Technology*. 23, 1015-1020.
- Berthelin, J., (1998) Les microorganismes dans la transformation des minéraux: incidence sur la formation, le fonctionnement et l'évolution des sols. In : Stengel P., Ed, *Sol Interface Fragile*, 83 91. INRA.

- Bihouix P., de Guillebon B., (2010) Quel futur pour les métaux ? Raréfaction des métaux : un nouveau défi pour la société. EDP Sciences.
- Blanchard, C., (2000) Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.
- Boon, D.Y., Soltanpour, P.N., (1992) Lead, cadmium and zinc contamination of Aspen garden soils and vegetation. *J. Environ. Qual.*, 21, 82–86.
- Bourrelrier, P.H., Berthelin, J., (1998) Contamination des sols par les Eléments en trace: les risques et leur gestion. Rapport n°42 à l'Académie des Sciences. Paris, France: Lavoisier Tec & Doc, pp. 440.
- Ceto, N., Mahmud, S., (2000) Abandoned mine site characterization and cleanup handbook, Environmental Protection Agency. p.129.
- Chanmugathas, P., Bollag, J.M., (1987) Microbial mobilization of cadmium in soil under aerobic and anaerobic conditions. *J. Environ. Qual.*, 16, 161–167.
- Charun, Y., Farmer, J.G., (2006) A comparative study of acid-extractable and total digestion methods for the determination of inorganic elements in peat material by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 557, 296-303.
- Chen, M., Lea, Q. M., Singh, S. P., Cao, R. X., Melamed, R., (2003) Field demonstration of in situ immobilization of soil Pb using P amendments. *Advances in Environmental Research*, 8, 93-102.
- Christensen, T.H., (1989b) Cadmium soil sorption at low concentrations: VIII, Correlation with soil parameters. *Water Air Soil Pollut.*, 44, 71 82.
- Chuan, M. C., Shu, G. Y., Liu, J. C., (1996) Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water, Air and Soil Pollution*, 90, 543-556.
- Clemens, S., M. G. Palmgren U. Krämer (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7, 309-315.
- Clevenger, T.E., (1990) Use of sequential extraction to evaluate the metals in mining wastes. *Water, Air and Soil Pollution*, 50, 241-254.
- Comans, R. N. J., Middelburg, J. J., (1987) Sorption of trace metals on calcite: applicability of the surface precipitation model. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51, 2587-2591.
- Cornelis, R., Caruso, J., Crews, H., Heumann, K., (2003) Handbook of elemental speciation Techniques and methodology. John Wiley, Chichester, UK.

- Cornu, S., Clozel, B., (2000) Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans les sols naturels. Analyse critique. In: Etude et Gestion des sols, vol 7, 3rd ed. 179-189.
- Davison, W., Zhang, H., (1994). In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature*, 367, 546–548.
- Dean, J.R., (1998) Extraction methods for environmental analysis. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Dean, J.R., (2005) Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Defaye, S., Plumail, D., Vitré E., (1998) Les boues d'épuration composent-elles un risque de pollution des sols? *Environnement et technique* 177, 41-44.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C., (2003) Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces: influence des micro-organismes du sol. Tec & Doc. - Lavoisier, Paris.
- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., Waterlot, C., (2008) Impact of a smelter close down on metal contents of wheat cultivated in the neighbourhood. *Environmental Science and Pollution Research*, 15, 162–169.
- Eick, M. J., Peak, J.D., Brady, P.V., Pesek, J.D., (1999) Kinetics of lead adsorption / desorption on goethite: residence time effect. *Soil Sci.* 164, 28-39.
- Ettler, V., Mihaljevic, M., Sebek, O., Grygar, T., (2007b) Assessment of single extractions for the determination of mobile forms of metals in highly polluted soils and sediments- Analytical and thermodynamic approaches. *Analytica Chimica Acta*, 602, 131–140.
- Evans, L.J., (1989) Chemistry of metal retention by soils. *Environmental Science and Technology*, 23, 1046-1056.
- Fillela, M., (2011) Antimony interactions with heterogeneous complexants in waters, sediments and soils: A review of data obtained in bulk samples. *Earth Science Reviews*, 107, 325-341.
- Fournier-Bidoz, V., Garnier-Laplace, J., (1994) Etude bibliographique sur les échanges entre l'eau, les matières en suspension et les sédiments des principaux radionucléides rejetés par les centrales nucléaires, Rapport IRSN SERE 94/073 (P).
- François, M., Dubourguier, H.C., Li, D., Douay, F., (2004). Prediction of heavy metal solubility in agricultural topsoils around two smelters by the physico-chemical parameters of the soils. *Aquatic Sciences*, 66, 78-85.

- Chaney R.I. (1983) Plant uptake of inorganic waste constituents. In: Parr, J.F.E.A. (Ed.), *Land Treatment of Hazardous Wastes*. Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ.
- Garnier-Laplace, J., Fournier-Bidoz, V., Baudin, J.P., (1997) Etat des connaissances sur les échanges entre l'eau, les matières en suspension et les sédiments des principaux radionucléides rejetés en eau douce par les centrales nucléaires. *Radioprotection*, 32: 49-71.
- Gebel, T., Claussen, K. & Dunkelberg, H., (1998) Human biomonitoring of antimony. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 71, 221-224.
- Gleyzes, C., Tellierr, S., Astruc, M., (2002) Fractionation studies of traces elements in contaminated soils and sediments: review of sequential extraction procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 451- 467.
- Gobat J., M., Aragno M., Matthey W., (2010) *Le sol vivant: Bases de pédologie - Biologie des sols* (3rd édition revue et augmentée). Ed. Presses Polytechniques et Unirsitaires Romandes. pp. 9 – 217.
- Gobat, J., Aragno, M. & Matthey, W., (1998) *Le sol vivant, bases de pédologie, biologie des sols*.
- Gonzalez, J.L., Tapie, N., Budzinski, H., Guyomarch, J., Crenn, V., Bretaudeau-Sanjuan, J., (2009a) Première évaluation des niveaux de contamination chimique des eaux littorales guyanaises dans le cadre de la préparation du volet "chimie" du contrôle de surveillance DCE - campagne Novembre 2008. Rapport final, Conventi on IFREMER / DIREN Guyane contrat n° 07/5 210 962/F, p. 42.
- González-Oreja JA., Rozas MA., Alkorta I., Garbisu C. (2008) Dendroremediation of heavy metal polluted soils. *Rev Environ Health* 23, 223-234.
- Goodarzi, F.H., Sanei, M., Labonte et Duncan, W.F., (2002) Sources of lead and zinc associated with metal smelting activities in the Trail area, British Columbia, Canada. *Journal of Environmental Monitoring* 4, 400-407.
- Gupta, S.K., Aten, C., (1993) Comparison and evaluation of extraction media and their suitability in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentrations in contaminated soils. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 51, 25-46.
- Hammel, W., Debus, R., Steubig, L., (2000) Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere*, 41, 1791-1798.

- Harper, M. P., Davison, W., Zhang, H. and Tych, W., (1998) Kinetics of metal exchange between solids and solution in sediments and soils interpreted from DGT measured fluxes. *Geochimica & Cosmochimica Acta* 62 (16), 2757-2770.
- Hazrat A., Khan E., Anwar Sajad M. (2013) Phytoremediation of heavy metal Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869-881.
- Hass, A., Fine, P., (2010) Sequential selective extraction procedures for the study of heavy metals in soils, sediments, and waste materials - a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40, 365–399.
- Hatira, A., Gallali, T., Rouiller, J. & Guillet, B., (1990) Stabilité et solubilité des complexes formés entre le cuivre, le plomb, le zinc et les acides fulviques. *Science du Sol*, 28, 123-135.
- Hauser, L., Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B., (2005) Column extraction of heavy metals from soils using the biodegradable chelating agent EDDS. *Environ. Sei. Technol.*, 39, 6819-6824.
- He, M. C., (2007) Distribution and phytoavailability of antimony at an antimony mining and smelting area, Hunan, China. *Environ. Geochem. Health*, 29, 209–219.
- Hetland, S., Martinsen I., Radzuk B., Thomassen Y., (1991) Species analysis of inorganic compounds in workroom air by atomic spectroscopy. *Anal. Sci.*, 7, 1029-1032.
- Hettiarachchi, G. M., Pierzynski, G.M., (2002) In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: influence of plant growth. *J. Environ. Qual.* 31, 564-572.
- Hinsinger, P., (1998a) How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy*, 64, 225–265.
- Hinsinger, P., (2001) Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In: Gobran G., Wenzel W. W., & Lombi E., Eds, *Trace elements in the rhizosphere*, 25–41. CRC Press LCC, Boca Raton, Florida, USA.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., & Jaillard, B., (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248, 43-59.
- Hoenig, M., (2001) Preparation steps in environmental trace element analysis-facts and traps. *Talanta*, 54, 1021-1938.
- Hoenig, M., Baeten, H., Vanhentenrijk, S., Vassileva, E., Quevauviller, Ph., (1998) Critical discussion on the need for an efficient minerilization procedure for the analysis of

- plant material by atomic spectrometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 358, 85-94.
- Hooda, P. S., Zhang, H., Davison, W., Edwards, A. C., (1999) Measuring bioavailable trace metals by diffusive gradients in thin films (DGT): soil moisture effects on its performance in soils. *European Journal of Soil Science* 50, 285-294.
- Hough, R. L., Young, S. D., Crout, N. M. J., (2003) Modelling of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn uptake, by winter wheat and forage maize, from a sewage disposal farm. *Soil Use Manage.* 19, 19-27.
- INRA, (2009) *Le Sol*. Ed. Quae, sous la direction de Stengel P., Brukler L., et Balesdent J., pp. 6.
- Jaillard, B., Hinsinger, P., (1993) Alimentation minérale des végétaux dans le sol. *Techniques agricoles*, 1210, 1-13.
- Jones, D. L., (1998) Organic acids in the rhizosphere. A critical review. *Plant and Soil* 205, 25-44.
- Juste, C. (1988) Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Science du Sol*. 26, 103-112.
- Juste, C., Chassin, P., Gomez, A., Linères, M., Mocquot, B., (1995) Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduaire des stations d'épuration urbaines, Convention ADEME-INRA, ADEME éd., pp. 209.
- Kabata-pendias, A., Pendias H., (1979) Trace elements in the biological environment. *Wyd. Geol. Warsaw*, p. 300.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., (1992) Trace elements in soils and plants. 2nd ed. CRC press.
- Kheboian, C., Bauer, C.F., (1987) Accuracy of selective extraction procedures for metal speciation in model aquatic sediments. *Anal. Chem.*, 59, 1417-1423.
- Koster, M., Reijnders, L., van Oost, NR., Peijnenburg, WJ., (2005) Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods. *Environ Pollut.* 133, 103–16.
- Krauskopf, K.B., Bird, D.K. (1995) Surface chemistry: the solution-mineral interface. In: *Introduction to geochemistry* (Ed M.G.-H.I. Editions) Mc Graw-Hill International Editions edn, Earth Sciences and Geology Series, ch.6, pp. 135-163.
- Kuboi, T., Noguchi, A., Yazaki, J., (1986) Family-dependent cadmium accumulation characteristics in higher plants. *Plant Soil.*, 92, 405–415.
- Kumar N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. (1995) Phytoextraction – the use of plants to remove heavy metals from soils. *Envi Sci and Technology* 29:1232-1238.

- Laperche V., Bodéan F., Dictor M. C., Baranger P., (2003) Guide méthodologique de l'arsenic appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52066-FR.
- Laureysens, I., De Temmerman, L., Hastir, T., Van Gysel, M., Ceulemans, R., 2005. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environmental Pollution* 133: 541-551.
- Lebourg, A., Sterckeman T., Ciesielski, H., Proix, N., (1996) Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie*, 16, 201-215.
- Legros, J.P., Martin, S., Baize, D., Rivière, J.M., Leprêtre, A., (2002) Accumulation de cuivre et de zinc dans une parcelle de l'Observatoire de la qualité des sols (OQS). In: D. Baize and M. Tercé. Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales. Paris: INRA, pp. 169-182.
- Lehto, N. J., Davison, W., Zhang, H., Tych, W., (2006) An Evaluation of DGT Performance Using a Dynamic Numerical Model. *Environmental Science and Technology* 40, 6368-6376.
- Lemanceau, P., Heulin, T., (1998) La rhizosphère. In: Stengel P., Ed, Sol interface fragile, 93–105. INRA.
- Lespagnol, G., (2003) Lixiviation du Chrome, du Cuivre et de l'Arsenic (CCA) à partir de sols contaminés sur des sites de traitement du bois. Thèse : Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Université Jean Monnet.
- Lozet, J., Mathieu, C., (1997) Dictionnaire de Science du Sol. Lavoisier, p. 269.
- Malá J., Cvrcková H., Máchová P., Dostál J., Síma P., (2010) Heavy metal accumulation by willow clones in short-time hydroponics. *J For Sci* 56, 28-34.
- Majone, M., Petrangeli Papini, M., Rolle, E., (1996) Modeling Lead adsorption on clays by models with and without electrostatic terms, *The Journal of Colloid and Interface Science*, 179, pp. 412 425.
- Manceau, A., Hargé, J.C., Hazemann, J.L., (1996) Etude de la spéciation in-situ de métaux lourds dans des sols contaminés. Rapport final Convention de Recherche 93150, Ministère de l'Environnement, Paris, France.
- Manceau, A., Lanson, B., Schlegel, M.L., Hargé, J.C., Musso, M., Eyberhard-Bérard, L., Hazemann, J.L., Chateigner, D. & Lambelle, G.M., (2000) Quantitative Zn speciation in smelter contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *American Journal of Science*, 300, 289-343.

- Margui, E., Queral, I., Hidalgo, M., (2009) Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. Trends in Analytical Chemistry, 28, 362 – 372.
- Markert, B., (1995) Sample preparation for trace element analysis in plant matrices. Science of the Total Environment, 176, 45 – 61.
- Marseille, F., Tiffreau, C., Laboudigue, A., Lecomte, P., (2000) Impact of vegetation on the mobility and bioavailability of trace elements in a dredged sediment deposit; a greenhouse study. Agronomy, 20, 547-556.
- Martinez, C.E., McBride, M.B., (1998) Solubility of Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , and Zn^{2+} in aged coprecipitates with amorphous iron hydroxides. Environmental Science & Technology, 32, pp.743 748.
- Mason, S., Hamon, R., Nolan, A., Zhang, H., Davison, W., (2005) Performance of a mixed binding layer for measuring anions and cations in a single assay using the diffusive gradients in thin films technique. Anal. Chem., 77, 6339-6346.
- Masscheleyn, P. H., Delaune, R. D., Patrick, W. H. J., (1991) Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. Environmental Science and Technology, 25, 1414-1419.
- McBride, M.B., (1994) Environmental chemistry of soils. Oxford University Press, New York, p. 406.
- Mckendry P., (2002a) Energy production from biomass (part 1): conversion technologies, Bioresource Technology 83(1): 47.
- Mckendry P., (2002b) Energy production from biomass (part 2): conversion technologies, Bioresource Technology 83(1):47.
- McLaughlin, M.J. and Singh, B.R., (1999) Cadmium in soils and plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 273.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., (2000) Soil testing for heavy metals. Communications in Soil Science and Plant Analysis 31, 1661-1700.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegehuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., (2007b) Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. Environmental and Experimental Botany 60, 385–396.
- Melaku, S., Gelaude, I., Vanhac, F., Moens, L., Richard, D., (2003). Comparison of Pyrolysis and Microwave Acid Digestion techniques for the Determination of Mercury in Biological and Environmental Materials. Microchimica Acta, 142, 7-12.

- Mench, M., J. Tancogne, A., Gomez, Juste, C., (1989) Cadmium bioavailability to *Nicotiana tabacum* L., *Nicotiana rustica* L., and *Zea mays* L. grown in soil amended or not amended with cadmium nitrate. *Biol. Fertil. Soils*, 8, 48–53.
- Mench, M., Vangronsveld, J., Didier, V., Clijsters, H., (1994) Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilization by chemical agents in a limed-silty soil. *Environmental Pollution*, 86, 279-286.
- Muhammad, I., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., (2012) Cadmium and Zn availability as affected by pH manipulation and its assessment by soil extraction, DGT and indicator plants. *Sci. Total. Environ.* 416, 490–500.
- Mulchi, C., Adamu, C.A., Bell, P.F., Chaney, R.L., (1992) Residual heavy metal concentrations in sludge amended coastal plain soils. II: Predicting metal concentrations in tobacco from soil test information. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 23, 1053-1069.
- Murciego, A., Sanchez, A.G., Gonzalez, M.A.R., Pinilla Gil, E., Toro Gordillo, C., Cabezas Fernández, J., Buyolo Triguero, T., (2007) Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environmental Pollution*, 145, 15–21.
- Nelms, S., (2005) *ICP Mass Spectrometry Handbook*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Newman, M.C., & Jagoe, C.H., (1994) *Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. Bioavailability: physical, chemical and biological interactions*. J. M. Heamelin, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson. Boca Raton, USA, Lewis Publishers.
- Nriagu, J. O., (1984) Formation and stability of base metal phosphates in soils and sediments. In *Phosphate Minerals* (eds. J. O. Nriagu and P. B. Moore), Springer Verlag, New York. pp. 318-329.
- Nriagu, J.O., (1989) A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338, 47- 49.
- O'Day P.A., (2006) *Chemistry and mineralogy of arsenic. Elements*, vol. 2, pp. 77–83.
- Osterlund, H., Chlot, S., Faarinen, M., Widerlund, A., Rodushkin, I., Ingri, J., Baxter, D.C., (2010) Simultaneous measurements of As, Mo, Sb, V and W using a ferrihydrite diffusive gradients in thin films (DGT) device. *Anal. Chim. Acta.*, 682, 59 – 65.

- Pais, I., Benton Jones, J., (2000) The handbook of Trace Elements. Boca Raton, FL, St. Lucie Press pp.223.
- Panther, J., Stillwell, K.P., Powell, K.J. Downard, A.J., (2008) Development and application of the diffusive gradients in thin films technique for the measurement of total dissolved inorganic arsenic in waters. *Anal. Chim. Acta*, 622, 133-142.
- Pitter, P., (1999) *Hydrochimie*. Praha: VSCHT 3^{ed} édition, p. 568.
- Pottier M, García de la Torre VS, Victor C, David LC, Chalot M, Thomine S (2015) Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environ Pollut* 199:73-82.
- Potts, P.J., Ellis, A.T., Kregsamer, P., Marshall, J., Streli, C., West, M., Wobrauschek, P., (2004) Atomic spectrometry update. X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, 1397 - 1419.
- Pranar, K., Shankararaman, C., (2007a) Microwave digestion ICP-MS for elemental analysis in ambient airborne fine particulate matter. *Analytica Chimica Acta*, 599, 170-176.
- Pranar, K., Shankararaman, C., David, W.M. (2007b). Microwave-assisted extraction of rare earth elements from Petroleum refining catalysts and ambient fine aerosols prior to inductively coupled plasma- mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 581, 247-259.
- Pratas, J., Prasad, MNV., Freitas, H., Conde, L., (2005) Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *Journal of Geochemical Exploration*, 85, 99–107.
- Pueyo, M., López-Sánchez, J.F., Rauret, G., (2004) Assessment of CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta*, 504, 217–226.
- Quevauviller, P.H., Rauret, G., Lopez-Sanchez, J.F., Rubio, R., Ure, A., Muntau, H., (1997) Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) follow a three-step sequential extraction procedure, *The Science of the Total Environment*, 205, 223-234.
- Radmila, M., Blaz, K., (2003) Determination of Zn, Cu, Pb, Ni and Cr in some Slovenian food stuffs. *Eur. Food Res. Technology*, 217, 211-214.
- Remon, E., (2006) Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de biodépollution. Thèse. Université Jean Monnet Faculté des Sciences et Techniques.

- Richter, R.C., Link, D. Kingston, H.M., (2001) Microwave-enhanced chemistry. *Analytical Chemistry*, 73, 31-37.
- Rieuwerts, J., Farago M., Cikrt, M., Bencko, V., (1999) Heavy metal concentrations in and around households near a secondary lead smelter. *Environmental Monitoring and Assessment*, 58, 317-335.
- Robert, M., (1996) *Le sol: interface pour l'environnement*, Ressource pour le développement. Masson, Paris, pp. 244.
- Rollemberg, M.C., & Simoes Goncalves, M.S.L., (2000) Kinetics of uptake of cadmium by "Chlorella marina" in different media. *Bioelectrochemistry*, 52, 57-62.
- Ross, S.M., (1994) Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils. Dans: *Toxic metals in soil-plant systems*. Editeur (Ross, S.M.). John Wiley & Sons, 63-153.
- Salomons, W., Forstner, U., (1980) Trace metal analysis on polluted sediments II. Evaluation of environmental impact, *Environ Technol. Lett.*, 1, 506-510.
- Salomons, W., Förstner, U., (1988) *Chemistry and Biology of Solid Waste (dredged material and mine tailings)*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. pp. 301.
- Schwertmann, U., Carlson L., (1994) Aluminium influence on iron oxides: XVII. unit-cell parameters and aluminium substitution of natural goethites. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 58, 256-261.
- Serpaud, B., Al-Shukry, R., Casteignau, M. and Matejka, G., (1994) Adsorption des métaux lourds (Cu, Zn, Cd et Pb) par les sédiments superficiels d'un cours d'eau: rôle du pH, de la température et de la composition du sédiment. *Revue des Sciences de l'eau*, 7, 343-365.
- Sezgin, N., Ozcan, H. K. Demir, G., Nemliogluet, S., Bayat, C., (2004) Determination of heavy metal concentrations in street dusts in Istanbul E-5 highway. *Environment International* 29, 979-985.
- Sigg, L., Behra, P. and Stumm, W., (2001) *Chimie des milieux aquatiques: chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*. Dunod, Paris, pp.567.
- Sigg, L., Behra, P., Stumm, W., (2000) *Chimie des milieux aquatiques. Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*. 3ème édition, Dunod, Paris.
- Singh, B.R., Steinnes, E., (1994) Soil and water contamination by heavy metals. In *Soil Processes and Water Quality. Advances in Soil Science 1994*. R. Lal and B.A. Stewart, (eds.). Lewis Publishers, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp. 233-270.

- Sogn, A.T., Eich-Greatorex, S., Røyset, O., Øgaard, A.F., Almas, A.R., (2008) Use of diffusive gradients in thin films to predict potentially bioavailable selenium in soil. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 39, 587- 602.
- Song, J., Zhao, F.J., Luo, Y.M., McGrath, S.P., Zhang, H., (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ Pollut.*, 3, 307–15.
- Sposito, G., (1989) *The chemistry of soils*. Edition Oxford University Press, pp. 277.
- Stepniewska, Z, Bucior, K., (2001) The conditions favourable to oxidation of Cr (III) to Cr (VI) and the presence of chromium forms on the area contaminated by tannery wastes. *Folia Histochem Cytobiol.*, 39, 146 -7.
- Stevenson, F.J., (1994) *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons, New York.
- Stockdale, A., Davison, W., Zhang, H., (2008) High-resolution two-dimensional quantitative analysis of phosphorus, vanadium and arsenic, and qualitative analysis of sulfide, in a freshwater sediment. *Environ. Chem.*, 5143 -149.
- Stockdale, A., Davison, W., Zhang, H., (2010) 2D simultaneous measurement of the oxyanions of P, V, As, Mo, Sb, W and U. *J. Environ. Monit.*, 12, 981-984.
- Stumm, W., & Morgan, J.J., (1996) *Aquatic chemistry – Chemical equilibria and rates in natural waters*. John Wiley & Sons, New York, pp.1022.
- Sturgeon, R.E., Willie, S.N., (1995) Continuous flow microwave assisted digestion of environmental samples using atomic spectrometric detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10, 981-986.
- Swift, R., McLaren, R., (1991) Micronutrient adsorption by soils and soil colloids. In Bolt, G.H.; Boodt, M.F.; Hayes, M.H.B.; McBride, M.B. (Ed.) *Interactions at the soil colloid-soil solution interface*. Dordrecht: Kluwer Academic Publications. 257-292.
- Tazisong, A., Senwo, Z. N., Taylor, R. W., Mbila, M. O., Wang, Y., (2004) Concentration and distribution of iron and manganese fractions in Alabama ultisols. *Soil Sci.* 489-496.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, 51, 844-851.
- Thomas, F., Rakotonarivo, E., Bottero, J.Y., (1993) La charge de surface des solides divisés: origine, mesure et modélisation. *Bull. Sci. Géol.*, 46, 217-227.
- Tipping, E., Rieuwerts, J., Panb, G., Ashmorec, M.R., Loftsa, S., Hillc, M.T.R., Faragob, M.E., Thornton, I., (2003) The solid–solution partitioning of heavy metals (Cu, Zn,

- Cd, Pb) in upland soils of England and Wales. *Environmental Pollution*, 125, 213-225.
- Toillon, Rollin, Dallé, Feinard-Duranceau, Bastien, Brignolas, et Marron. 2013. « Variability and plasticity of productivity, water-use efficiency, and nitrogen exportation rate in *Salix* short rotation coppice». *Biomass Bioenergy* 56: 392–404.
- Trivedi, P., Axe, L., (2001) Predicting divalent metal sorption to hydrous Al, Fe, and Mn oxides. *Environmental Science and Technology*, 35, 1779-1784.
- URE, A.M., (1996) Single extraction schemes for soil analysis and related applications. *The Science of the Total Environment*, 178, 3-10.
- Ute, K., Sandra, J., Jurgen, K and Eckard, J., (2005) Determination of arsenic species in fish Oil after acid digestion. *Microchimica Acta*, 151, 249-255.
- van Alphen, M., (1999) Atmospheric heavy metal deposition plumes adjacent to a primary lead zinc smelter. *Science of the Total Environment*, 236, 119-134.
- Van der Perk, M., (2006) Soil and Water Contamination, from molecular to catchment scale. Van Gestel, C. & Hensbergen, P. (1997): Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1177-1186.
- Vangronsveld J., Herzig R., Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E., Van Der Lelie D., Mench M. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res* 16,765-794.
- Walker, C., Hopkin, S., Sibly, R. & Peakall, D. (1996) *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis.
- Wilson, S. C., Peter, V., Lockwood, P. V., Ashley, P. M., Tighe, M., (2010) The chemistry and behavior of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. *Environ. Pollut.*, 158, 1169-1181.
- WRB, IUSS Working Group WRB, (2006) World reference base for soil resources 2006 (2nd Ed). *World Soil Resources Report No. 103*. FAO, Rome. pp. 95-96.
- Xia, K., Bleam, W., Helmke, P. A., (1997a) Studies of the nature of binding sites of first row transition elements bound to aquatic and soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61, 2223-2235.
- XRF Laboratory. Elemental Analysis using the XRF technique, (2010). http://omega.physics.uoi.gr/Xrf/english/the_Xrf_technique.

- Xu, J., Thornton, I., (1985) Arsenic in garden soils and vegetable crops in Cornwall: implications to human health. *Environ Geochem Health*, 7, 131-133.
- Xu, Y., Schwartz, F. W., Traina, S. J., (1994) Sorption of Zn^{2+} and Cd^{2+} on hydroxyapatite surfaces. *Environmental Science and Technology*, 28, 1472-1480.
- Yang, Y., Ratte, D., Smets, BF., Pignatello, JJ., Grasso, D., (2001) Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. *Chemosphere* 43, 1013-1021.
- Youssef, RA., Chino, M., (1989a) Root-induced changes in the rhizosphere of plants. I. pH changes in relation to the bulk soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 35, 461-468.
- Zachara, J. M., Cowan, C. E., Resch, C. T., (1991) Sorption of divalent metals on calcite. *Geochimica & Cosmochimica Acta*, 55, 1549-1562.
- Zhang, H., Davison, B., (1995) Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.*, 67, 3391– 400.
- Zhang, H., Davison, W., (1999) Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT and DET techniques. *Analytica Chimica Acta* 398, 329-340.
- Zhang, H., Lombi, E., Smolders, E., Mc Grath, S., (2004) Kinetics of Zn Release in Soils and Prediction of Zn Concentration in Plants Using Diffusive Gradients in Thin Films. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 3608-3613.
- Zlotorzynski, A., (1995) The application of microwave radiation to analytical Chemistry, *Critical Review in Analytical Chemistry*, 25, 43-76.
- Zoltan, M., Ralph, S., (2004) Sample preparation for trace element analysis In: *Comprehensive analytical chemistry. Spectrochemica Acta*, part B 59, 1943 – 1944.

Bashar Hussein QASIM

Détermination, spéciation et la biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminés et technosols

Cette thèse a porté sur la détermination et l'étude écodynamique d'éléments traces métalliques sur des technosols fortement contaminés en métaux et métalloïdes en contexte de revégétalisation naturelle ou de phytoremédiation.

Deux schémas d'extractions séquentielles ont été utilisés conjointement à des extractions sélectives en parallèle avec la détermination de la concentration totale dans les sols, de la concentration totale dissoute dans les eaux porales, du pool labile (sondes DGT) et des tests de germination avec des haricots nains pour étudier la spéciation, la mobilité et la phytodisponibilité de métaux et métalloïdes (Zn, Pb, Cd, As et Sb) pour les technosols de deux sites post-minier (La Petite Faye) et industriel (Mortagne-du-Nord).

De plus de jeunes plants de *P. euramericana* Dorskamp ont été cultivés en rhizobox sur les technosols de Mortagne-du-Nord pour étudier l'effet rhizosphérique sur la mobilité des métaux. Enfin l'effet de l'addition d'azote sous forme de nitrate et d'ammonium sur le comportement de ces métaux a été également étudié pour *P. euramericana* Dorskamp sur ces mêmes sols. Malgré les fortes concentrations totales en métaux et métalloïdes dans les sols du site de La Petite Faye, la mobilité de ces éléments potentiellement toxiques est limitée car associés à la fraction résiduelle. La phytodisponibilité est également limitée et corrélée avec le pool labile des technosols.

La culture de *P. euramericana* Dorskamp a généré un effet rhizosphérique caractérisé par une augmentation de la valeur du pH et la concentration de carbone organique dissout (COD) de la solution de sol ainsi qu'une diminution des concentrations totale dissoute des métaux (Zn, Pb et Cd) dans la solution de sol. L'addition d'azote sous forme de nitrate et d'ammonium a respectivement augmenté et diminué le pH de la solution de sol et dans le cas de l'ammonium a augmenté également le COD et stabilisé les métaux dans la rhizosphère par rapport aux sols de contrôle.

Mots clés : Eléments traces métalliques, technosols contaminés, mobilité, phytodisponibilité, effet rhizosphérique, peuplier.

Determination, speciation and bioavailability study of trace metals in contaminated soils and technosols

This thesis dealt with the determination and study of the ecodynamics of trace metals in technosols highly contaminated in metals and metalloids in the context of natural revegetalisation or phytoremediation.

Two sequential extraction schemes were used jointly with selective extractions in parallel with the determination of the total metals concentration in soils, the total dissolved metals concentration in the soil pore water, the metals labile pool (DGT) and germination tests with dwarf beans to investigate the speciation, mobility and phytoavailability of (Zn, Pb, Cd, As and Sb) for technosols of two post-mining (La Petite Faye) and industrial (Mortagne du Nord) sites. Additionally, young plants of *P. euramericana* Dorskamp were cultivated in rhizobox on Mortagne du Nord technosols to investigate the rhizospheric effect on the mobility of metals. Moreover, the effect of nitrogen addition under nitrate and ammonium on the behavior of these metals has been investigated for *P. euramericana* Dorskamp for the same soils.

Despite the high total metals and metalloids concentration in the La Petite Faye soils, the mobility of these potentially toxic elements is limited because of their association with the residual fraction. The phytoavailability is also limited and correlated with the labile pool of technosols.

The culture of *P. euramericana* Dorskamp generated a rhizospheric effect characterized by an increase of the pH and concentration of dissolved organic carbon (DOC) in the soil pore water and a decrease in the total dissolved concentration of metals (Zn, Pb et Cd) in the soil pore water. The addition of nitrogen under nitrate or ammonium respectively increased and decreased the soil pore water pH and in the case of ammonium the DOC also increased and stabilized metals in the rhizosphere in comparison to control soils.

Keywords: Trace metals, contaminated technosols mobility, phytoavailability, rhizospheric effects, poplar.



ISTO, UMR 7327 – CNRS/Université d'Orléans
1A, rue de la Férollerie,
45071 ORLEANS CEDEX 2, France



