

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

Laboratoire de Physiologie, Écologie et Environnement

Institut National de Recherche en Génie Rural, Eaux et Forêts

THÈSE EN COTUTELLE INTERNATIONALE présentée par :

Oumaima AYADI

soutenue le : 15 décembre 2025

pour obtenir le grade de : **Docteur de Université d'Orléans
et de l'Université de Carthage**

Discipline/ Spécialité : Biologie / Géologie

**Comportement et mobilité des éléments
traces métalliques dans des sols
environnant la mine de Tamra :
contribution à la phytoremédiation par
Casuarina glauca et rôles de la
microflore bactérienne**

THÈSE dirigée par :
BOURGERIE Sylvain
BÉJAOUI Zoubeir

Maître de conférences, Université d'Orléans
Professeur, FSB _ Université de Carthage

RAPPORTEURS :
COURTIN Alexandra
CHAFFEI HAOUARI Chiraz

Professeure, Université Paris-Saclay
Professeure, FST_ Université Tunis El Manar

JURY :
COURTIN Alexandra
CHAFFEI HAOUARI Chiraz
BOURGERIE Sylvain
BÉJAOUI Zoubeir
MLAYAH Ammar
MOTELICĂ-HEINO Ștefan Mikael
TLILI Khawla

Professeure, Université Paris-Saclay
Professeure, FST_ Université Tunis El Manar
Maître de conférences, Université d'Orléans
Professeur, FSB _ Université de Carthage
Professeur, CERTE _ Université de Carthage
Professeur, Université d'Orléans - **Président du jury**
Maître de conférences, FSB _ Université de Carthage

Dédicaces

Je commence par rendre grâce à Allah, source de toute lumière, de force et de sagesse, qui m'a guidée et soutenue tout au long de ce parcours.

Du fond de mon cœur, je dédie ce travail :

*À mes chers parents **Samia** et **Hedi**, dont l'amour inconditionnel, les sacrifices et la confiance constante ont été le socle de ma persévérance et de mes réussites.*

*À mon frère **Yosri**, pour son soutien indéfectible et ses encouragements dans les moments de doute, qui ont illuminé mon chemin et renforcé ma détermination.*

À ma grande famille.

Remerciements

Cette thèse, qui représente des années de recherche, d'études et de merveilleuses interactions humaines et scientifiques, n'aurait jamais pu être réalisée sans l'aide, l'engagement et la générosité de nombreuses personnes, auxquelles je serai éternellement reconnaissante.

Je souhaite, tout d'abord, exprimer mes remerciements les plus sincères à mes encadrants de thèse, pour leur suivi attentif tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme **khawla Tlili**, ma co-encadrante, pour son accompagnement continu, sa disponibilité et son soutien inébranlable. Je la remercie pour sa patience, ses encouragements et ses précieux conseils, tant sur le plan scientifique qu'humain, qui m'ont apporté un immense réconfort et une aide inestimable. Je lui suis également reconnaissante pour sa générosité et sa bienveillance, et souhaite que ces lignes témoignent de toute ma reconnaissance.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à M. **Sylvain Bourgerie** pour sa supervision consciencieuse, ses directives éclairées et sa confiance inébranlable. Sa rigueur scientifique, sa capacité d'enseignement et sa bienveillance ont créé pour moi un environnement de travail motivant et enrichissant.

Je tiens à faire part de ma profonde appréciation à M. **Zoubeir Béjaoui**, dont l'expertise, l'encadrement exceptionnel et le soutien indéfectible tout au long de ce travail ont été le pilier de sa réussite. Leur disponibilité et leur soutien constant ont transformé ce défi en une expérience d'apprentissage exceptionnelle. Je leur suis sincèrement reconnaissante pour leur accompagnement, leurs remarques constructives et leur engagement à faire de cette thèse un projet abouti et rigoureux. Merci à vous trois !

Je tiens à adresser tous mes remerciements au **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de Tunisie** pour le financement de mon séjour en France durant ces trois années.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements les plus sincères à M. **Domenico Morabito** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, ainsi que pour ses recommandations avisées et son analyse scientifique pertinente. Son soutien a été une source d'inspiration tout au long de ces trois années.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie tout particulièrement les rapporteuses, Mme **Alexandra Courtin** et Mme **Chiraz Chaffei Haouari**, ainsi que M. **Ammar Mlayah** et M. **Mikael Motelica-Heino**, pour la qualité de leurs échanges scientifiques et de leurs recommandations.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux membres du comité de suivi, Mme **Fabienne Battaglia-Brunet**, M. **Frédéric Lamblin** et Mme **Marilyne Soubrand** pour leur accompagnement, leurs observations constructives et leurs conseils avisés tout au long de ce travail, qui ont enrichi cette recherche.

Je souhaite également exprimer ma profonde reconnaissance à **Marta Sena Velez** pour son soutien inestimable dans l'exécution des expériences de microbiologie. Ses compétences et sa disponibilité ont grandement contribué à la réussite de ce travail expérimental.

Je voudrais adresser un immense merci à M. **Steeve Thany**, directeur du laboratoire de physiologie, écologie et environnement (P2E, ex-LBLGC), pour son accueil convivial et pour les excellentes conditions de travail qu'il offre au sein du laboratoire.

Je voudrais rendre hommage à tous les membres du laboratoire P2E pour leur soutien, leurs discussions enrichissantes et la convivialité de tous les jours, qui ont rendu ces années de recherche particulièrement plaisantes.

Je suis reconnaissante envers M. **Mabrouk Boughdiri**, chef du département de géologie à la Faculté des Sciences de Bizerte, de m'avoir fourni les ressources indispensables à l'accomplissement de ce travail.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à M. **Khalil Khamassi**, maître de conférences à l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunis pour son accueil chaleureux et pour avoir considérablement facilité la réalisation de mes travaux d'analyse au sein de son laboratoire. Je tiens particulièrement à souligner ses remarquables qualités humaines et sa générosité sans limites.

Je remercie chaleureusement **Fathi Chattouti**, ingénieur à la mine de fer de Tamra, pour son assistance dans la collecte des échantillons sur le site minier de Tamra dans le cadre de cette recherche ainsi que pour ses qualités humaines.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à M. **Mokhtar Ghsir**, l'ancien directeur de la mine de Tmara, ainsi qu'au directeur actuel, M. **Mohamed Said Somrani**, pour leur appui et leur aide logistique.

Je tiens à témoigner de ma gratitude à Mme **Mejda Abbassi**, maître de conférences au laboratoire d'écologie forestière de l'Institut National de la Recherche en Génie Rural, Eaux et Forêts, pour son aide précieuse dans les démarches administratives, son écoute et sa grande générosité.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme **Randa Ben Abdallah** pour ses encouragements et son aide appréciable. Je remercie également M. **Hatem Zgallai** et M. **Rabeh Alouani** pour leurs échanges enrichissants et leurs encouragements motivants.

Je tiens aussi à remercier Mme **Imen**, Mme **Manel** et Mme **Monia**, techniciennes à la faculté des sciences de Bizerte, pour leur aide technique et leur disponibilité.

Je remercie également les pépiniéristes du laboratoire d'écologie forestière, **Mohamed Trabelsi**, **Lazher Sadok**, **Badereddine Hjaij** et **Ridha May**, pour leur aide sur le terrain.

Ma gratitude va également à mes collègues **Yassin**, **Sara**, **Maria** et **Khalid** pour leur générosité et leur aide dans les moments difficiles en France.

Je n'oublie pas mes chers amis **Chaima**, **Iheb**, **Nesrine**, **Samira** et **Sirine** pour leur aide et leurs encouragements.

Merci à vous tous !

Oumaima

Table des matières

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	6
1. Dynamique des éléments traces métalliques dans les sols miniers	7
1.1. Définition et spécificités des technosols miniers	7
1.2. Les éléments traces métalliques : origines, mobilité et toxicité	9
1.3. Facteurs influençant la mobilité des ETM dans les sols	16
1.4. Impacts des constituants du sol sur la dynamique des ETM	18
1.5. Impacts des ETM sur l'environnement et la santé humaine	24
2. Stratégies de remédiation	27
2.1. Stabilisation – immobilisation des ETM	29
2.2. Phytoremédiation : principes, et efficacité	35
2.3. Dynamiques des éléments traces métalliques dans le système sol-plante	39
2.3.1. Mécanismes de transfert des ETM du sol vers le système racinaire	39
2.3.2. Translocation des ETM des racines vers les parties aériennes	46
2.3.3. Tolérance des plantes vis-à-vis des ETM	47
2.3.4. Capacité de tolérance des plantes actinorhiziennes face aux ETM	49
2.3.5. Potentiel de <i>Casuarina glauca</i> dans les stratégies de phytoremédiation	50
3. Études microbiologiques des sols : rôles des microorganismes dans la remédiation des sols contaminés	51
3.1. Microbiologie des sols miniers et impacts des ETM	51
3.2. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale	54
4. Sites miniers en Tunisie : défis et stratégies de restauration	62
5. Enjeux environnementaux des sites miniers en Tunisie	67
5.1. Niveaux de contamination et spéciation des ETM	67
5.2. Biodiversité et dégradation des écosystèmes	68
5.3. Défis et perspectives de la réhabilitation des sites miniers en Tunisie	69
5.4. Études de cas et expériences internationales	70
6. Caractéristiques géographiques et environnementales de la zone d'étude : la mine de Tamra	72
6.1. Contexte historique et exploitation minière	72
6.2. Contexte géographique et géologique	73
6.3. Caractéristiques climatologiques et hydrographiques	77
6.4. Problématiques environnementales associées à l'exploitation de la mine de Tamra du site	78
Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra	82
1^{ère} partie : Comportement et mobilité des éléments traces métalliques dans les sols de Tamra et les risques environnementaux associés	83
Résumé de la publication	83
Article 1	85
2^{ème} partie : Impact des éléments traces métalliques sur la qualité du sol de la mine de Tamra : activités enzymatiques des sols	126
1. Introduction	126
1.1. Déshydrogénase	126
1.2. β -glucosidase	127
1.3. Phosphatases	128
1.4. Uréase	129
1.5. Activités hydrolytiques (vis-à-vis du diacétate de fluorescéine)	130
2. Matériel et méthodes	131
2.1. Activité déshydrogénase	131
2.2. β -glucosidase	131
2.3. Phosphatase acide (Pac) et phosphatase alcaline (Pal)	132

Table des matières

2.4. Uréase	132
2.5. Hydrolyse du diacétate de fluorescéine	133
2.6. Indices multienzymatiques	133
3. Résultats	134
4. Conclusion et perspectives	142
3^{ème} partie : Distribution verticale des éléments traces métalliques dans le sol de Tamra	144
1. Introduction	144
2. Matériel et méthodes	145
3. Résultats et discussion	147
3.1. Caractérisations physico-chimiques du profil pédologique	147
3.2. Spéciation des éléments traces métalliques (ETM)	153
3.3. Facteurs influençant la mobilité des ETM	156
3.4. Quantification de la pollution et évaluations des risques associés aux ETM	158
4. Conclusion et perspectives	163
Conclusion	165
Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales	168
1^{ère} partie : Évaluation du potentiel de bioaccumulation des éléments traces métalliques par les plantes autochtones du site minier de Tamra	169
1. Introduction	169
2. Matériel et méthodes	171
2.1. Choix des sites et méthodes de prélèvement des échantillons	171
2.2. Caractérisation des relevés floristiques	173
2.3. Propriétés physicochimiques des sols	174
2.3. Analyses des espèces végétales sélectionnées	175
2.4. Analyses statistiques	176
3. Résultats	176
3.1. Diversité et composition floristique globale de la mine de Tamra	176
3.2. Caractérisations physicochimiques des sols des relevés floristiques	183
3.3. Quantification des éléments traces métalliques dans les plantes du site minier de Tamra	184
3.4. Évaluation de la bioaccumulation et de la translocation des éléments traces dans les espèces étudiées	189
4. Conclusion et perspectives	193
2^{ème} partie : Évaluation de l'exposition de la population locale aux éléments traces métalliques et analyse des risques sanitaires associés	195
1. Introduction	195
2. Matériel et méthodes	197
2.1. Échantillonnages et analyses physicochimiques des eaux et des sols	197
2.2. Indice de qualité de l'eau (IQE)	199
2.3. Test de toxicité & de bioaccessibilité (phase gastrique)	200
2.4. Estimation des risques sanitaires	202
3. Résultats et discussion	205
3.1. Caractérisation des eaux de surface et des sources du site minier de Tamra	205
3.2. Bioaccessibilité des ETM	213
3.3. Estimation des risques sanitaires pour les populations locales	218
4. Conclusion et perspectives	230
Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expérience en pots	233
1. Résumé de la publication	235
2. Materials and Methods	241
2.1. Soils, Plant Material, Experimental Design, and Growth Conditions	241
2.2. Determination of Photosynthetic Gas Exchange, Water Use Efficiency, Chlorophyll Fluorescence and Total Dry Mass	243
2.3. Determination of Chlorophylls and Carotenoids Contents	243

Table des matières

2.4. Determination of Water Status	244
2.5. Determination of Plant Biochemical Responses	244
2.6. Trace Metals Concentrations in <i>Casuarina Glauca</i> Organs and Phytoremediation Indices	246
2.7. Statistical Analysis	247
3. Results	247
3.1. Total Dry Mass, Gas Exchanges, Chlorophyll Fluorescence and Chlorophyll Content.....	247
3.2. Water Status, Biochemical Compounds and Electrolyte Leakage	249
3.3. Accumulation and Phytoremediation Potentiality of Trace Metals.....	253
4. Discussion	257
5. Conclusions	260
References	261
Chapitre V. Identification et caractérisation des souches bactériennes indigènes du site minier de Tamra	265
1. Introduction	267
2. Matériel et méthodes	270
2.1. Isolement des bactéries.....	270
2.2. Tolérance des isolats aux ETM	270
2.3. Traits PGPR chez les souches bactériennes isolées et sélectionnées du sol minier de Tamra.	273
2.4. Identification des souches bactériennes.....	275
2.5. Effet combiné de la souche sélectionnée et d'un extrait aqueux de biochar d' <i>Eucalyptus</i> sur la germination des graines de <i>Casuarina glauca</i>	276
2.6. Analyses statistiques.....	278
3. Résultats	278
3.1. Isolement et caractérisation des souches bactériennes	278
3.2. Traits PGPR chez les 4 souches bactériennes isolées et sélectionnées du sol minier de Tamra.....	285
3.3. Identification moléculaire des souches.....	290
3.4. Effet combiné de la souche T9.2 (<i>Pseudomonas sp irchel</i>) et d'un extrait aqueux de biochar d' <i>Eucalyptus</i> sur la germination de <i>Casuarina glauca</i>	290
4. Discussion	293
4.1. Mécanismes de détoxification des ETM	294
4.2. Spécificité métal-isolat	295
4.3. Tolérance multi-métaux et effets d'interaction.....	296
4.4. Liens entre les caractéristiques PGPR et la tolérance aux éléments traces testés	297
4.5. Effet combiné de <i>Pseudomonas sp. irchel</i> et de l'extrait aqueux de biochar d' <i>Eucalyptus</i> sur la germination de <i>Casuarina glauca</i>	298
5. Conclusion et perspectives	300
Discussion générale	302
Perspectives de recherche	314
Conclusion	316
Références bibliographiques	320

Liste des figures

Chapitre I

Figure I. 1. Différentes sources anthropiques des éléments traces métalliques dans le sol (adapté d'Angon et al., 2024).	10
Figure I. 2. Schématisation des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité en cas d'ingestion d'une matrice contaminée (source : Eurofins Environnement France, 2023).	14
Figure I. 3. Dynamique des éléments traces métalliques dans le sol (d'après Mattigod et al. 1981).	19
Figure I.4. Les mécanismes de fixation des ETM dans le sol (adapté de Manceau et al. 2002 et repris de Deschamps et al. 2006).	23
Figure I. 5. Chaîne cyclique de contamination par les ETM (source : INERIS).	25
Figure I. 6. Impacts de la toxicité des éléments traces métalliques sur la santé humaine (adapté d'Aziz et al. 2023).	27
Figure I. 7. Les différentes techniques de remédiation des sols : les numéros correspondent aux différentes approches de chaque méthode ; + : anode ; et - : cathode (adapté de Koul & Taak, 2018).	29
Figure I.8. Les différents mécanismes d'adsorption et d'immobilisation des ETM dans les sols par le biochar (adapté de Hasan et al., 2024).	33
Figure I. 9. Principaux mécanismes de phytoremédiation (adapté de D'Souza & Paul, 2014)	36
Figure I. 10. Effets du biochar sur le sol contaminé et sur la plante	38
Figure I. 11. Transfert des ETM du sol vers la plante	43
Figure I.12. Mécanismes d'absorption racinaire : différence entre absorption active et passive (Adapté de Yang et al., 2021b).	44
Figure I.13. Voies de transfert apoplasmique et symplasmique au niveau de la racine : la numérotation indique les différentes étapes de ce transfert ; la coloration rose et la coloration bleue correspondent à la circulation des ions dans les racines par les deux voies ; la flèche grise : agrandissement de la zone (Hamdani, 2020)	45
Figure I. 14. Communautés microbiennes de la zone rhizosphérique (adaptée de Chamkhi et al., 2022).	55
Figure I. 15. Effets des PGPR sur les plantes (adaptée de Chandran et al., 2021).	58
Figure I. 16. Mécanismes impliqués dans la solubilisation du P par les bactéries solubilisant le phosphate (adaptée de Prasad et al., 2018).	59
Figure I. 17. Distribution géographique des mines en Tunisie (DGM, 2023).	65
Figure I. 18. a) Localisation du district de Nefza dans les principales unités tectonosédimentaires du nord de la Tunisie (adaptée de Decrée et al., 2008b modifiée d'après Rouvier et al., 1985 ; Savelli, 2002) ; b) vue panoramique du site minier de Tamra (AO©, 2022)	73
Figure I. 19. a) Localisation de la mine de Tamra sur la carte géologique nationale ; b) Carte géologique de la mine de Tamra (d'après Gottis, 1952).	74
Figure I. 20. a) Coupe transversale de la zone de Sidi Driss –Tamra (adaptée de Decrée et al., 2008) ; b) Carte structurale de la mine de fer de Tamra (adaptée d'après Gottis & Sainfeld, 1952 ; Rovier, 1987 et Bouzouada, 1992).	75
Figure I. 21. Log lithologique de la mine de Tamra (adaptée d'après Decrée et al., 2008b).	77
Figure I. 22. Stockage des terrils sur le site minier : a) la teneur en Fe varie entre 14 et 16 % ; et b) la teneur en Fe est inférieure à 11 % (AO©).	80

Chapitre II

Figure II. 1. Production de la fluorescéine (Vitecek et al., 2007).	130
Figure II. 2. Activités enzymatiques de différents échantillons de sol : T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra, T4, T5 et T6 : au milieu de la mine de Tamra et T7, T8 et T9 : en aval de la mine de Tamra.	135
Figure II.3. Analyse en composantes principales (ACP).	139
Figure II. 4. Indices de qualité des différents échantillons de sol : T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra ; T4, T5 et T6 : au milieu de la mine de Tamra ; et T7, T8 et T9 : en aval de la mine de Tamra : a) moyenne géométrique (MGea), b) indice d'altération trois (IA3), c) indicateur de pH enzymatique (Pal/Pac)..	141
Figure II.5. Profil pédologique du site minier de Tamra à une profondeur totale de 734 cm.	146
Figure II.6. Caractérisations physico-chimiques du profil pédologique des 9 horizons : a) pH (H ₂ O) ; b) conductivité électrique (CE, $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) ; c) teneur en matière organique (MO, %) ; d) surface spécifique (Ss, $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ; e) perméabilité (K, $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$) ; f) porosité (P, %).	148
Figure II. 7. Granulométrie des sols du profil vertical	151
Figure II. 8. Classification des sols du profil vertical selon le diagramme des textures.	152
Figure II. 9. Pourcentages des éléments traces dans chaque fraction d'après l'extraction séquentielle de BCR.	154
Figure II. 10. a) Facteur de contamination (FC) et b) Facteur d'enrichissement (FE) des échantillons du profil pédologique.	159
Figure II.11. a) code d'évaluation des risques (CAR, %) et b) indice de géoaccumulation (Igeo) des échantillons du profil pédologique.	161

Liste des figures

Figure II. 12. a) facteur de risque environnemental (FRE) et b) indice de charge polluante (ICP) du profil pédologique. _____	163
---	-----

Chapitre III

Figure III. 1. Bétail pâtureant sur le site minier de Tamra (AO©). _____	170
Figure III. 2. Localisation des relevés floristiques sur le site minier de Tamra _____	171
Figure III. 3. a) Méthodologie de détermination de l'aire minimale des relevés floristiques ; b) Photo du relevé floristique n° 1 ; c) Photo du relevé floristique n° 2. _____	173
Figure III. 4. Images illustratives de toutes les plantes herbacées du relevé floristique n°1. _____	181
Figure III. 5. Images illustratives de toutes les plantes herbacées du relevé floristique n°2. _____	182
Figure III. 6. Concentration des éléments traces dans les organes des espèces sélectionnées (mg.kg ⁻¹ , MS : masse sèche) : a) fer (Fe), b) zinc (Zn), c) manganèse (Mn), d) plomb (Pb), e) cadmium (Cd), et f) arsenic (As) : Parties aériennes en violet et parties racinaires en rose. Chaque valeur représente la moyenne ± l'écart type (n = 3). Les lettres indiquent une différence significative (p < 0,05) selon le test LSD. _____	185
Figure III. 7. Analyses en composantes principales (ACP) des concentrations des éléments traces (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans a) les parties racinaires et b) les parties aériennes des 6 espèces étudiées : <i>Arisarum vulgare</i> O Targ. TOZZ (AV), <i>Oxalis pes-caprae</i> (OX), <i>Vinca major</i> (VM), <i>Myosotis sicula</i> (MY), <i>Sherardia arvensis</i> (Sh), <i>Paspalum</i> (PP). Les cercles colorés correspondent aux groupes d'espèces végétales. _____	187
Figure III. 8. Facteurs de translocation des espèces végétales étudiées. _____	190
Figure III. 9. Topographie du site minier de Tamra : a) Pente du site : la flèche rouge correspond à sa direction vers le nord ; b) Flux des eaux de ruissellement : (AO©). _____	196
Figure III. 10. Zones de drainage minier : a) eau de surface (ER1); b) eau de surface (ER2). (AO©). _____	198
Figure III. 11. Eaux de source : a) Aïn El Bell ; b) Aïn El Mota ; c) Aïn El Rechech. (AO©). _____	199
Figure III. 12. Concentrations des éléments traces des eaux de surface et des eaux potables de la zone minière de Tamra _____	207
Figure III. 13. Analyse en composantes principales (ACP) _____	210
Figure III. 14. Résultats du test de germination des graines de <i>L. sativum</i> en présence des eaux de surface et des eaux potables de la zone minière de Tamra. _____	212
Figure III. 15. Fractions bioaccessibles des éléments traces (mg/kg de poids sec) des différents échantillons de sol T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra, T4, T5 et T6 : au milieu de la mine de Tamra et T7, T8, T9 : en aval de la mine de Tamra _____	215

Chapitre V

Figure V. 1. Étapes d'isolement de souches bactériennes à partir des sols miniers de Tamra. _____	279
Figure V. 2. Densités optiques (mesurées à 600nm) des cultures (après 24 heures) des six souches sélectionnées (T2, T3.1, T3.2, T7, T9.1 et T9.2) en présence de différentes concentrations des éléments étudiés (à 0, 50, 100, 300 et 500 mg/l) : a) fer (Fe), b) zinc (Zn), c) manganèse (Mn). _____	281
Figure V. 3 a) Tests in vitro des éléments traces étudiés (Fe, Mn, Pb, Zn, Cd, et As) d'évaluation de la croissance (sur milieu LB) des six isolats testés en présence de différentes concentrations de Fe, Mn ou Zn (50, 100, 300, et 500 mg/L) ou bien en présence de Pb, Cd et As (5, 10, 30, et 50 mg/L); b) dénombrement des colonies bactériennes (CFU/ml) pour les plus fortes concentrations en ETM tolérée, après 48 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne ± écart type (n=3). _____	283
Figure V. 4. Vitesse spécifique de croissance des souches (μ , h ⁻¹) pour les souches T2, T3.2, T7 et T9.2 en présence d'un cocktail des éléments traces à différentes concentrations _____	284
Figure V. 5. Capacité des souches testées (T2, T3.2, T7 et T9.2) à fixer l'azote après 48 heures d'incubation sur le milieu NFb (Nitrogen Free broth) : +++ : forte fixation ; ++ : moyenne ; + : faible fixation. _____	286
Figure V. 6. Production d'ammonium (NH ₄ ⁺ , nmol. L ⁻¹) par les souches testées (T2, T3.2, T7 et T9.2) après 48 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne ± écart type (n=3). Les lettres indiquent une différence significative selon le test LSD (p < 0,05). _____	287
Figure V. 7. Solubilisation du phosphate par les isolats bactériens testés (T2, T3.2, T7 et T9.2) après 24 heures d'incubation à 30°C sur une gélose de Pikovskaya (PVK). _____	288
Figure V. 8. Concentration (μ g/ml) d'auxine produite par les 4 souches testées après 24 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne ± écart type (n=3)). _____	289
Figure V. 9. Résultats de test de bioaugmentation avec les graines endémiques de <i>Casuarina glauca</i> après 17 jours de germination _____	292

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I. 1. Méthodes d'extraction simple des ETM dans le sol _____	12
Tableau I.2. Récapitulatif des protocoles, les plus couramment appliqués, de mesures in vitro de la bioaccessibilité des ETM _____	15
Tableau I.3. Exemples d'études montrant l'efficacité du biochar dans la stabilisation des ETM _____	34
Tableau I.4. Récapitulatif de quelques études récentes sur la phytostabilisation assistée par le biochar _____	41

Chapitre II

Tableau II. 1. Corrélation de Pearson entre les activités enzymatiques, les concentrations biodisponibles des éléments traces, la teneur en matière organique, le pH et la teneur en argile ($p < 0,05$). _____	137
Tableau II. 2. Corrélation de Pearson entre les concentrations biodisponibles des éléments traces et les caractéristiques physico-chimiques des sols du profil pédologique ($p < 0,05$). _____	157

Chapitre III

Tableau III. 1. Échelle des coefficients d'abondance-dominance de Braun-Blanquet (1932). _____	174
Tableau III. 2. Composition floristique des relevés étudiés. _____	178
Tableau III. 3. Propriétés physicochimiques des sols. _____	183
Tableau III. 4. Facteur de bioconcentration des espèces végétales étudiées. _____	192
Tableau III. 5. Classification selon l'indice de qualité de l'eau (Aher et al., 2016). _____	200
Tableau III. 6. Valeurs de référence des paramètres utilisés (USEPA, 1989; 2002; DEA, 2010). _____	203
Tableau III. 7. Doses de référence (DRf) et facteurs de pente (FP) des éléments traces étudiés (USEPA, 1989, 2002; DEA, 2010; Luo et al., 2012, Oyebamiji et al., 2024). _____	204
Tableau III. 8. Qualités physico-chimiques des eaux de surface et eaux potables de la zone minière de Tamra : Aïn El Bell (AB) ; Aïn El Mota (AM) ; Aïn El Rechech (AR) ; eau de surface à proximité du point T3 (ER1) et eau de surface à proximité du point T6 (ER2). _____	206
Tableau III. 9. Risques non cancérogènes pour les enfants de la zone d'étude : QR-ing : quotient de risque par ingestion ; QR-res : quotient de risque par voie respiratoire ; QR-cut : quotient de risque par contact cutané ; ID : indice de dangerosité. _____	219
Tableau III. 10. Risques non cancérogènes pour les adultes de la zone d'étude : QR-ing : quotient de risque par ingestion ; QR-res : quotient de risque par voie respiratoire ; QR-cut : quotient de risque par contact cutané ; ID : indice de dangerosité. _____	222
Tableau III. 11. Risques cancérogènes par ingestion, voie respiratoire et contact cutané pour les enfants et les adultes de la zone d'étude : RC : Risque cancérogène ; RCT : Risque cancérogène total. _____	227

Chapitre V

Tableau V. 1. Évaluation de la tolérance des souches isolées des sols miniers de Tamra vis-à-vis du plomb, du cadmium ou de l'arsenic à la concentration de 50 mg. L ⁻¹ . _____	280
Tableau V. 2. Récapitulatif des principaux traits PGPR pour les 4 souches sélectionnées (T2, T3.2, T7 et T9.2) : +++ : Production forte ; ++ : production modérée ; + : production faible ; - : absence de production. _____	289
Tableau V. 3. Identification moléculaire des souches bactériennes basée sur le séquençage _____	290

Liste des abréviations

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate
AIA : Acide indole-3-acétique
BCR : Bureau de Référence de la Communauté européenne
 β -glu : β -glucosidase
CAT : Aatalase
CAR : Code d'évaluation des risques
CRR : Croissance relative des racines
DH : Déshydrogénase
DQC : Dose quotidienne chronique
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
FC : Facteur de contamination
FDA : hydrolyse du diacétate de fluorescéine
FE : Facteur d'enrichissement
FRE : Facteur de risque environnemental
G (%) : pourcentage de germination des graines
GI (%) : indice de germination
GRR : taux de germination relatif des racines
GPX : Glutathion peroxydase
GSH : Glutathion
GR : Glutathion réductase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
IA3 : Indice d'altération trois
ICP : indice de charge polluante
ID : Indice de dangerosité
Igeo : Indice de géoaccumulation
IQE : Indice de qualité de l'eau
MGea : Moyenne géométrique
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
Pac : Phosphatase acide
Pal : Phosphatase alcaline
PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
POD : Peroxyde dismutase
QR : quotients de risque
RCT : Risque cancérogène total
SOD : Superoxyde dismutase
SVI : Indice de vigueur
Ure : Uréase

Introduction générale

Introduction générale

L'exploitation minière est un secteur fondamental de l'économie mondiale, fournissant des ressources naturelles essentielles à de nombreux secteurs industriels. Cependant, cette activité génère d'importants impacts environnementaux et sanitaires principalement en raison des fortes teneurs en éléments traces métalliques (ETM) toxiques tels que l'arsenic (As), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et le mercure (Hg). À l'échelle internationale, plusieurs études ont montré que les sols à proximité des sites miniers peuvent présenter des niveaux de contamination extrêmement élevés, dépassant largement les seuils critiques recommandés par l'organisation mondiale de la santé (OMS) et l'agence de protection de l'environnement (EPA) (Baah *et al.*, 2023; Belle *et al.*, 2024; Musa *et al.*, 2025).

En Tunisie, la richesse géologique et minéralogique est importante, liée à la position du pays sur la bordure septentrionale du domaine cratonique saharien légèrement déformé. Cette situation confère au territoire tunisien une diversité géologique notable à laquelle correspond une distribution géographique spécifique des sites miniers majoritairement localisés dans les régions du nord (Boussen *et al.*, 2010). Ainsi, la zone nord-ouest de la Tunisie est caractérisée par un contexte géologique prédominant favorisant la minéralisation du plomb, du zinc et du fer (Decrée *et al.*, 2008; Bouzidi *et al.*, 2018). Plusieurs études ont révélé des menaces écologiques sérieuses affectant les terres agricoles et les écosystèmes aquatiques de ces régions, en raison de fortes teneurs en ETM détectées jusqu'aux horizons profonds du sol, indiquant ainsi des impacts environnementaux à long terme (Ayari *et al.*, 2021; Nouairi *et al.*, 2021). Ces observations posent des défis majeurs qui nécessitent, en urgence, des stratégies efficaces de remédiation.

Le district minier de Nefza (situé au nord-ouest de la Tunisie) recèle plusieurs gisements métallifères fortement contaminés par les ETM (Kraiem *et al.*, 2024), notamment la zone minière du site de Tamra, objet de la présente étude (Dekoninck *et al.*, 2018). Cette mine de fer à ciel ouvert, dernière encore exploitée en Tunisie, est caractérisée par une histoire géologique complexe avec des processus magmatiques et hydrothermaux influençant la libération et la mobilité des ETM (Dekoninck *et al.*, 2018; Ben Aissa *et al.*, 2023). Si cette activité a contribué

Introduction générale

aux revenus nationaux et offre une source d'emploi et de stabilité sociale dans la région de Nefza, elle a également engendré des impacts environnementaux et sanitaires importants, en raison d'une forte contamination multi-métallique (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, Pb et As). Par ailleurs, l'activité minière, le stockage des terrils sur la couche arable à l'air libre et la dominance des réseaux hydriques constituent d'autres facteurs de risque. De plus, en l'absence de mesures de protection, ces contaminants, soumis à l'érosion éolienne et hydrique en raison du climat méditerranéen, aggravent la pollution des eaux de surface et souterraines ainsi que les sols environnants. Ces multiples pressions exposent les populations riveraines à des risques sanitaires non négligeables, soulignant la nécessité de mettre en place des pratiques d'éco-réhabilitation durables afin d'atténuer, voire de résoudre les problèmes qui en résultent.

Face à ces enjeux, l'évaluation de la spéciation et de la biodisponibilité des ETM dans les sols miniers constitue une étape cruciale pour comprendre leurs comportements géochimiques et les risques associées (Danala *et al.*, 2025). Ces informations permettent également d'élaborer des stratégies de gestion ciblées des sites miniers pour atténuer les impacts environnementaux et sanitaires. Dans ce contexte, la phytoremédiation fait l'objet d'une attention particulière pour la réhabilitation des sites contaminés en raison de son efficacité et de son coût relativement faible (Phang *et al.*, 2024). Bien que prometteuse, cette approche présente certaines limites, notamment dans le contexte minier, en raison de la complexité des interactions entre les éléments traces examinés, les conditions environnementales et climatiques sévères et les niveaux élevés de contaminations par les ETM. La combinaison des stratégies de réhabilitation, avec, en particulier, des amendements organiques, peut renforcer son efficacité, grâce à leurs effets complémentaires sur la stabilisation des métaux et la stimulation de la croissance végétale.

Dans ce contexte, la présente recherche vise à étudier la spéciation des éléments traces prédominants dans les sols miniers de Tamra. Bien que plusieurs études antérieures aient été menées sur ce site (Decrée *et al.*, 2008, 2009, 2010, 2013; Dekoninck *et al.*, 2018; Trifi *et al.*, 2018), elles demeurent limitées dans la mesure où elles sont principalement concentrées sur sa teneur en fer, sa sédimentologie, sa minéralogie et sa géochimie isotopique sans aborder la spéciation et la mobilité des ETM. A ce jour, aucune étude n'a encore permis de caractériser en profondeur ce site ni d'étudier les risques associés aux ETM. Il apparaît donc nécessaire (1) d'évaluer les caractéristiques du site minier de Tamra en réalisant des approches intégrées

Introduction générale

(physicochimiques, géochimiques, biologiques) afin de mieux appréhender ses impacts environnementaux et sanitaires ; et (2) de tester une approche combinant *Casuarina glauca*, une espèce ligneuse à croissance rapide, capable de former au niveau racinaire une symbiose avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia* et un biochar issu d'*Eucalyptus*. L'interaction entre *C. glauca* et le biochar choisis pourrait ainsi constituer une nouvelle approche de gestion des sols contaminés dans le contexte minier nord-africain.

L'objectif général de cette thèse est de comprendre le comportement, la spéciation et la mobilité de ces ETM dans les sols miniers, tout en évaluant la faisabilité de stratégie de phytoremédiation innovante. Cette stratégie repose sur la synergie entre l'espèce *C. glauca*, l'actinobactérie *Frankia* et le biochar d'*Eucalyptus* pour assainir les sols contaminés en ETM et préserver les nappes phréatiques.

Pour atteindre cette finalité, trois sous-objectifs sont définis :

Objectif 1 : Établir un diagnostic environnemental complet de l'état actuel du site minier de Tamra afin d'évaluer la spéciation et la mobilité des ETM, et d'estimer les risques écologiques et sanitaires associés ;

Objectif 2 : Évaluer l'efficacité du biochar d'*Eucalyptus* sur la résilience écophysologique de plants de *Casuarina glauca* et sur l'atténuation des stress dans le sol minier de Tamra (contaminé par Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, As) ;

Objectif 3 : Examiner l'effet combiné biochar-bactérie (*Pseudomonas sp.*) sur la germination des graines de *C. glauca* endémiques en tant que preuve de concept d'une phytoremédiation assistée.

Afin d'atteindre ces objectifs, ce travail repose sur une approche méthodologique multidisciplinaire articulée autour de trois axes principaux : *i*) une caractérisation physicochimique, géochimique et minéralogique des sols miniers de Tamra ; *ii*) des études écophysologiques et microbiologiques afin d'évaluer l'impact des ETM sur la flore locale et la diversité microbienne locales ; et finalement *iii*) des essais de phytoremédiation et de bioaugmentation assistée pour tester l'efficacité combinée de *C. glauca*-bactéries- biochar d'*Eucalyptus* en conditions contrôlées.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration interdisciplinaire entre l'université de Carthage en Tunisie et l'université d'Orléans en France, dans le cadre d'une cotutelle internationale, enrichissant ainsi l'étude d'une expertise complémentaire.

Introduction générale

La thèse est structurée en cinq chapitres :

Le premier chapitre est consacré à l'état de l'art sur la dynamique des éléments traces métalliques dans le contexte minier, les stratégies de remédiation biologique, l'activité minière en Tunisie et finalement la présentation de la mine de Tamra.

Le deuxième chapitre détaille la caractérisation des sols miniers de Tamra. Ce chapitre comprend trois parties : la première rédigée sous forme d'un article accepté dans *International Journal of Environmental Science and Technology*, repose sur la spéciation des ETM et l'évaluation des impacts environnementaux à différents points géographiques au sein du site minier de Tamra ; la deuxième décrit l'évaluation de l'impact des ETM sur la qualité du sol ; et finalement, la troisième présente les résultats de la distribution verticale des ETM et les risques écologiques associés.

Le troisième chapitre expose les résultats des impacts écotoxicologiques des ETM. Ce chapitre comporte deux parties : la première présente l'impact des ETM sur la flore endémique du site minier de Tamra ; et la deuxième partie décrit l'évaluation des risques sanitaires associés à ces contaminants.

Le quatrième chapitre, rédigé sous forme d'un article publié dans la revue *Land*, expose les résultats de la mise en œuvre d'un procédé de phytostabilisation assistée dans des conditions contrôlées et l'effet combiné *C. glauca*-*Frankia*-biochar sur la stabilisation des ETM examinés dans le sol.

Le cinquième chapitre est consacré, dans un premier temps, à la caractérisation des souches bactériennes indigènes du site minier de Tamra. Ensuite, il décrit l'effet combiné du biochar d'*Eucalyptus* et de bactéries sur la germination de *C. glauca*, sous conditions contrôlées (sans ajout des ETM).

Une discussion générale revient sur le cadre scientifique, synthétise les principaux résultats, souligne les limites du travail et propose des perspectives de recherche future.

La **conclusion générale** clôture le manuscrit.

La présente étude apporte une contribution significative à la géochimie environnementale et à l'éco-réhabilitation des sols contaminés, offrant de nouvelles pistes de recherches dans le contexte minier nord-africain. Elle propose des perspectives respectueuses de l'environnement en valorisant les ressources locales telles que l'utilisation des espèces végétales indigènes, le partenaire microbien naturel et du biochar localement disponible. Par ailleurs, ce travail pourrait

Introduction générale

constituer une base scientifique utile pour l'élaboration de politiques environnementales adaptées au contexte tunisien, tout en fournissant des enseignements transférables à d'autres environnements similaires à travers le monde.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Dynamique des éléments traces métalliques dans les sols miniers

Le sol, ressource naturelle vitale, joue un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes. Il constitue une source de biodiversité et intervient dans les cycles biogéochimiques, en étroite relation avec la sécurité alimentaire et la conservation de l'environnement. Cependant, l'impact des activités industrielles sur sa fertilité est de plus en plus intense, ce qui entraîne des sols très anthropisés. Les activités minières occupent une place prépondérante parmi les nombreuses contraintes anthropiques qui affectent les sols, en perturbant non seulement leur structure et leur biodiversité mais également leur composition chimique, notamment par la dispersion d'éléments traces métalliques (ETM), dont la dynamique représente un véritable défi scientifique et écologique.

1.1. Définition et spécificités des technosols miniers

L'Union Internationale des Sciences du Sol a récemment intégré les technosols à la base de référence mondiale des ressources en sols, qui constitue un système de classification international (IUSS, 2007). Les technosols se caractérisent par des propriétés influencées, en partie ou en totalité, par l'activité humaine. Ils se distinguent par la présence de matériaux d'origine techno-génique issus d'une ancienne activité (déchets industriels par exemple), du déclin de l'activité (démantèlement des bâtiments, remblais) ou de la stratégie de réhabilitation du sol (apport de substrats exogènes). (IUSS Working Group WRB, 2014 ; Abbruzzini *et al.*, 2025). Ces activités peuvent modifier la composition de la faune du sol et limiter sa colonisation (Colombini *et al.*, 2022) et altérer les propriétés microbiennes et physico-chimiques du sol (Durand *et al.*, 2024). Les technosols sont définis également par la présence d'au moins 20 % d'artefacts dans les 100 premiers centimètres, ou par la présence d'une couche cimentée ou indurée à une profondeur inférieure à 10 cm, ou par la présence d'une géomembrane continue, ou encore par la présence de matériaux techniques durs à partir de 5 cm de profondeur (IUSS Working Group WRB, 2022). Dans le contexte minier, les sols sont considérés comme des technosols du fait de l'incorporation de minéraux d'origine profonde, issus de l'exploitation minière, qui modifient significativement leur composition et leurs propriétés (Miu *et al.*, 2022). Les résidus miniers et/ou les stériles font également partie des technosols. Ils se caractérisent généralement par des concentrations accrues en ETM et un appauvrissement en nutriments, ce qui compromet le développement du couvert végétal (Miu *et al.*, 2022). Les technosols

présentent également des caractéristiques particulières directement liées à l'exploitation des ressources minérales, notamment : *i*) les opérations de déblaiement, *ii*) l'extraction du minerai, et *iii*) les procédés de traitement et d'enrichissement. Ils sont souvent affectés par une altération structurale sévère. Les technosols peuvent présenter une faible porosité, une mauvaise aération ainsi qu'une capacité de rétention d'eau réduite. Les technosols miniers peuvent être exposés à des glissements de terrain et à l'érosion, entraînant ainsi leur instabilité. Lors des premiers stades de pédogenèse des technosols, la stratification des matériaux est souvent anarchique et ne présente pas d'horizons pédologiques marqués. Certains technosols peuvent développer des horizons séparés au cours du temps. Cependant, ce processus est souvent lent et influencé par des conditions externes telles que la flore et les travaux de réhabilitation (Colombini *et al.*, 2023). Leur composition hétérogène entraîne une variabilité de leurs propriétés physico-chimiques et minéralogiques. Leur texture est souvent grossière, contenant une faible proportion d'argile et de limons, ce qui nuit à la fertilité du sol. La capacité d'échange cationique (CEC) est généralement faible, réduisant leur capacité à retenir les substances nutritives. En outre, l'acidité des technosols, favorise l'altération des minéraux primaires et la mise en place des minéraux néoformés tels que la kaolinite et la smectite, qui sont nécessaires pour la fertilité et la structure du sol. Dans les conditions acides, la formation d'oxydes et d'oxyhydroxydes de fer, tels que la goethite et l'hématite est favorisée, ce qui facilite la rétention des ETM. Le régime hydrique des technosols peut moduler les processus biogéochimiques qui interviennent dans la transformation des minéraux, l'activité microbienne jouant un rôle important dans le cycle d'oxydoréduction du fer et la stabilisation des minéraux (Kumar *et al.*, 2024). Les technosols hydrophiles ont tendance à favoriser la présence de divers minéraux argileux et hydroxydes hydratés en raison d'une meilleure rétention de l'humidité, tandis que les technosols hydrophobes peuvent limiter la formation de minéraux (Fabbri *et al.*, 2021). L'acidité excessive et l'hydrophobicité continues des technosols peuvent rendre mobiles les ETM, qui peuvent contrecarrer les avantages de la formation de minéraux (Fabbri *et al.*, 2021). La forte toxicité des technosols, combinée à leur pauvreté en nutriments, réduit la biodiversité du site, ce qui se traduit par une faible teneur en carbone organique. Ce déficit affecte l'incorporation de la matière organique (MO), principalement en raison d'une activité microbiologique et fongique limitée. Ces conditions affectent la dynamique des ETM, dont les concentrations sont souvent élevées dans ces environnements.

1.2. Les éléments traces métalliques : origines, mobilité et toxicité

Les éléments traces métalliques (ETM) sont des éléments naturels de la croûte terrestre, dont la mobilité et la toxicité sont devenues des préoccupations majeures en raison des activités anthropiques. Ils peuvent en effet pénétrer dans divers milieux environnementaux et avoir de graves conséquences sur la santé des êtres vivants.

Les ETM dans le sol sont considérés comme des éléments toxiques (Banuelos & Ajwa, 1999), mais seulement une partie d'entre eux présente un intérêt écologique, biologique et économique. Il est crucial de comprendre leurs origines, leur mobilité et leur toxicité pour pouvoir traiter les risques qui y sont associés.

1.2.1. Origines et sources des éléments traces métalliques dans le sol

Les ETM sont largement dispersés dans la plupart des sols du monde (FAO, 1972). Ils sont issus de sources naturelles et anthropiques :

Naturellement, les roches ignées et les roches sédimentaires constituent les sources les plus courantes des ETM dans le sol (Cannon *et al.*, 1978). La croûte terrestre est constituée de roches sédimentaires dans une faible proportion (environ 5 %) et de roches ignées à 95 % (Peters *et al.*, 2021). Les ETM sont naturellement présents dans le sol via l'altération des roches mères par la transformation des minéraux primaires et secondaires. Au cours de la pédogenèse, ils se concentrent dans certains horizons pour former le fond géochimique (Palumbo *et al.*, 2000). Leurs concentrations naturelles varient en fonction de la géologie locale.

Les ETM peuvent ensuite être libérés dans le sol sous l'effet de divers processus naturels, tels que l'érosion, la lixiviation, les éruptions volcaniques, les processus biologiques, les mouvements tectoniques et les vents de surface (Timothy & Williams, 2019).

Les activités industrielles telles que le secteur des produits chimiques, la fabrication des matières radioactives et métallurgiques, et les activités agricoles, notamment les engrais chimiques, les pesticides, les amendements et les produits de traitements phytosanitaires sont les principales sources anthropiques des ETM dans le sol (Figure I.1). Souvent ubiquistes dans l'environnement, ces éléments présentent un risque accru pour la santé humaine et les équilibres écologiques. Souvent ubiquistes dans l'environnement, ces éléments présentent un risque accru pour la santé humaine et les équilibres écologiques.

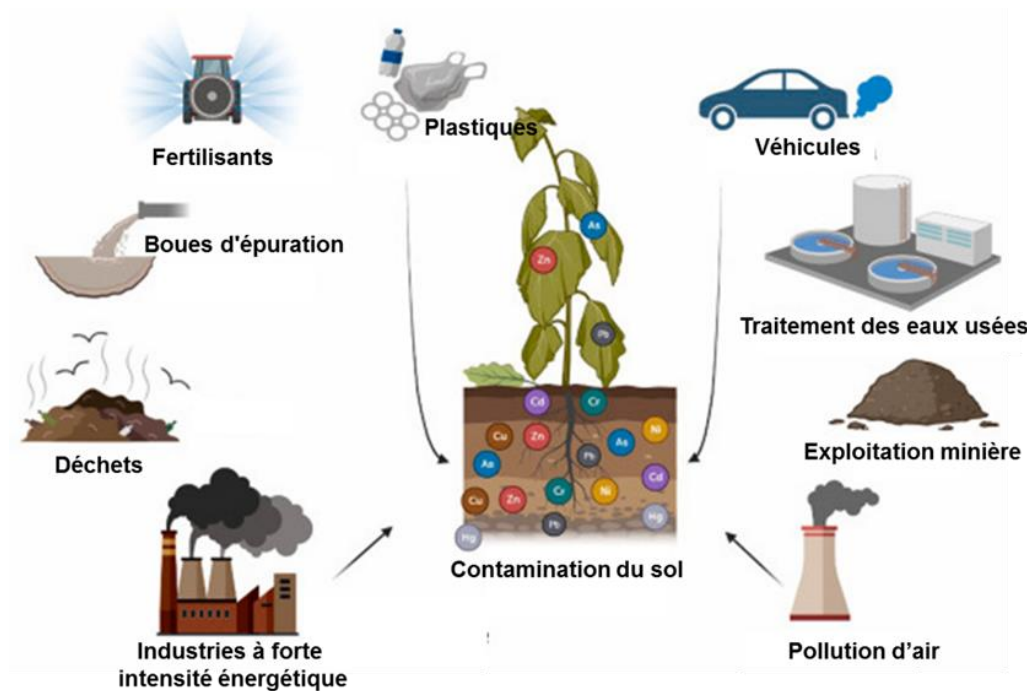


Figure I. 1. Différentes sources anthropiques des éléments traces métalliques dans le sol (adapté d'Angon *et al.*, 2024)

1.2.2. Spéciation, mobilité et biodisponibilité des ETM

Les ETM sont des contaminants persistants dans le sol. Ils se trouvent que les ETM conditionnent leur biodisponibilité et par conséquent, leur toxicité. Ainsi, pour évaluer de manière approfondie les risques associés à la présence des ETM dans le sol et déterminer le potentiel de sa réhabilitation, il est essentiel de comprendre leur comportement dans le sol. Celui-ci est étroitement lié à leur spéciation, leur mobilité et leur cycle biogéochimique. En effet, la spéciation des ETM dans le sol est définie comme étant l'ensemble des formes chimiques sous lesquelles l'élément existe dans ce milieu (Adamo *et al.*, 2024). Elle permet d'identifier la nature des liaisons chimiques des métaux ou métalloïdes avec les composants du sol. En effet, les formes chimiques des ETM influencent leur potentiel à être mobilisés et bioaccumulés. Les méthodes utilisées pour l'étude de la spéciation doivent être sensibles, garantir des limites de détection faibles et offrir une forte sélectivité. Cette exigence particulièrement lorsque la teneur des autres composants de l'échantillon est potentiellement supérieure à celle de l'analyte. De plus, ils doivent permettre de séparer l'élément étudié de la matrice de l'échantillon sans modifier sa composition originale (Clough *et al.*, 2022). En outre,

plus la concentration de l'élément analysé est faible, plus l'incertitude des résultats est élevée, des stratégies supplémentaires devant être ajoutées à la procédure d'analyse afin d'en garantir la fiabilité. Dans le sol, le risque de changement de spéciation est possible même lors de la prise d'échantillon, sans compter les modifications chimiques ou les conditions de stockage de l'échantillon. Afin d'étudier la spéciation des polluants dans le sol, on distingue deux groupes d'approches :

- i) Méthodes physiques : basées sur l'utilisation des rayons X ; permettent d'approcher directement la spéciation d'un métal donné à l'aide de procédés analytiques non destructifs, c'est-à-dire sans altérer la structure ou la matrice contenant cet élément. Parmi ces méthodes figurent (1) la diffraction des rayons X (DRX) qui permet de caractériser la minéralogie des phases cristallisées et de quantifier ainsi les phases porteuses et (2) la microscopie analytique telle que, la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique à transmission (MET), permettant d'identifier les éléments présents dans les phases minérales ; et (3) la microsonde électronique, qui permet de déterminer les caractéristiques chimiques quantitatives des phases minérales (Rawat *et al.*, 2022). Ces méthodes fournissent une analyse multiélémentaire, mais elles présentent des limites de détection trop élevées pour l'analyse d'échantillons environnementaux biologiquement sensibles, en particulier à l'état de traces (Neumeister *et al.*, 2016). Elles peuvent, en revanche, servir de techniques de soutien à l'analyse de la spéciation.
- ii) Méthodes chimiques : la spéciation des ETM peut être déterminée à partir d'extractions effectuées en présence de réactifs spécifiques, définis soit de manière fonctionnelle (extraction simple), soit de manière opérationnelle (extraction séquentielle multiple) afin de fractionner les espèces ETM en fonction de leur interaction avec les composants de la phase solide présente dans le sol (Ali *et al.*, 2024).

L'extraction simple est une méthode utilisée pour étudier la disponibilité des ETM pour les plantes en utilisant divers réactifs, suivie d'une lecture à l'aide de détecteurs élémentaires. Ces réactifs varient des acides très forts, tels que l'acide nitrique ou l'acide chlorhydrique, les complexants organiques tels que l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) et diéthylène

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Tableau I. 1. Méthodes d'extraction simple des ETM dans le sol

Réactifs		Intérêts	Limites	Références
Acides forts	Acide nitrique (NHO ₃)	- Dissolution efficace des ETM, y compris ceux liés aux matières organiques	- Risque de perte de certains éléments par volatilisation.	Asher <i>et al.</i> , 2020 Hseu <i>et al.</i> , 2004
	Acide chlorhydrique (HCl)	- Solubilisation efficace des ETM liés aux carbonates et aux oxydes	- Risque de sous-évaluation des métaux liés à la matière organique et aux sulfures.	Voelz <i>et al.</i> , 2019
Complexants organiques	Acide Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA)	- Extraction des ETM biodisponibles	- Risque de surestimation des métaux réellement mobiles dans le sol. - Faible efficacité pour les métaux liés à des phases minérales stables.	Adamo <i>et al.</i> , 2024 Cao <i>et al.</i> , 2008
	Acide Diéthylène Triamine Penta Acétique (DTPA)	- Efficace pour les sols alcalins et ceux à faible taux en matière organique	- Moins efficace que l'EDTA.	Mekala <i>et al.</i> , 2019
		- Extraction des ETM biodisponibles	- Risque de modification de l'extraction des ETM par le pH et par la composition du sol.	Meers <i>et al.</i> , 2007
Solutions salines (CaCl ₂ et NaCl ₂)		-Extraction des ETM mobiles, en particulier pour les métaux présentant une faible affinité avec les particules du sol.	- L'efficacité de l'extraction est influencée par la composition du sol et la nature du métal. - Risque de sous-évaluation des ETM liés à des phases minérales et organiques.	Adamo <i>et al.</i> , 2024 Pueyo <i>et al.</i> , 2004 Zhang <i>et al.</i> , 2022

triamine penta acétique (DTPA) aux solutions salines, telles que le chlorure de calcium ou le nitrate d'ammonium (Tableau I.1). Par ailleurs, L'extraction séquentielle est une méthode chimique qui permet de séparer les différentes fractions des ETM dans le sol en utilisant une série de réactifs de force croissante.

Tessier *et al.* (1979) ont été l'un des premiers à utiliser le procédé d'extraction séquentielle en 5 étapes permettant de subdiviser les métaux et les métalloïdes sous forme échangeable, liée au carbonate, liée à l'oxyde, liée à la matière organique et enfin ceux correspondant à la fraction résiduelle. Ce protocole a été modifié par de nombreux chercheurs (Förstner *et al.*, 1981 ; Shuman, 1985 ; Clevenger, 1990) en changeant le nombre d'étapes ou les réactifs utilisés. Le Bureau Communautaire de Référence (BCR) a mis en œuvre un programme d'harmonisation des protocoles d'extraction séquentielle. Il a défini le fractionnement en quatre étapes (1) la fraction acido-soluble F1, correspondant à la fraction échangeable, hydrosoluble, et carbonatée ; (2) la fraction réductible F2, représentant la fraction associée aux oxyhydroxydes de fer et de manganèse, différenciée selon leur cristallinité (amorphe et cristallisée) ; (3) la fraction oxydable F3, comprenant les ETM associés à la matière organique et aux sulfures et (4) la fraction résiduelle F4, comprenant les ETM intégrés dans les réseaux cristallins (Pérez-Cid *et al.*, 1998).

Bien que ces méthodes soient largement utilisées, elles présentent certaines limites potentielles qui peuvent influencer la précision des résultats. En effet, la lixiviation chimique ne permet pas toujours d'extraire toutes les formes des ETM, en particulier ceux qui sont liés aux fractions résiduelles, ce qui conduit à une sous-estimation de la biodisponibilité. D'autre part, la composition du sol peut également, affecter l'efficacité de l'extraction, entraînant des résultats de spéciation biaisés (Tang *et al.*, 2024). En outre, les différents protocoles d'extraction donnent des résultats variables, ce qui complique les comparaisons entre les études. Malgré ces limites, les méthodes chimiques restent précieuses pour apprécier la spéciation des ETM et orienter les stratégies de restauration. Cependant, une approche fondée sur ces méthodes pourrait ne pas prendre en compte certains éléments clés de la chimie du sol et du comportement des ETM. Ainsi, la combinaison de l'extraction chimique et de méthodes physiques permet de mieux comprendre la spéciation des métaux (Parvin *et al.*, 2022).

En plus de la spéciation, la mobilité d'un élément trace métallique est l'un des facteurs clés déterminant son comportement dans le sol. Elle se définit par la capacité de ces composés à se

transférer entre les différents compartiments du sol, la phase liquide représente le compartiment ultime de la solution du sol. Cette dernière est le principal réservoir de nutriments pour les plantes et les organismes vivants du sol (Kabata-Pendias, 2004), ce qui accroît leur biodisponibilité. Cette biodisponibilité fait référence à leur capacité d'être absorbés par un organisme vivant. En effet, la bioaccessibilité ou la fraction bioaccessible d'un élément présent dans le sol est sa biodisponibilité physiologique à travers les différentes voies pour pénétrer dans l'organisme vivant. Cette fraction peut donc augmenter les risques sanitaires.

Ainsi, la simulation des attaques des particules contaminées dans le système gastro-intestinal (salive, sucs gastriques et intestinaux) ou dans le système pulmonaire (mucus) permet de déterminer sa teneur (Zeng *et al.*, 2019) (Figure I.2). Ce type d'expérience, ne pouvant être réalisé sur la population humaine, a conduit au développement de protocoles *in vitro*, non invasifs, permettant d'approcher la biodisponibilité des éléments étudiés à partir de solutions chimiques imitant le tractus gastro-intestinal (Dima *et al.*, 2020).

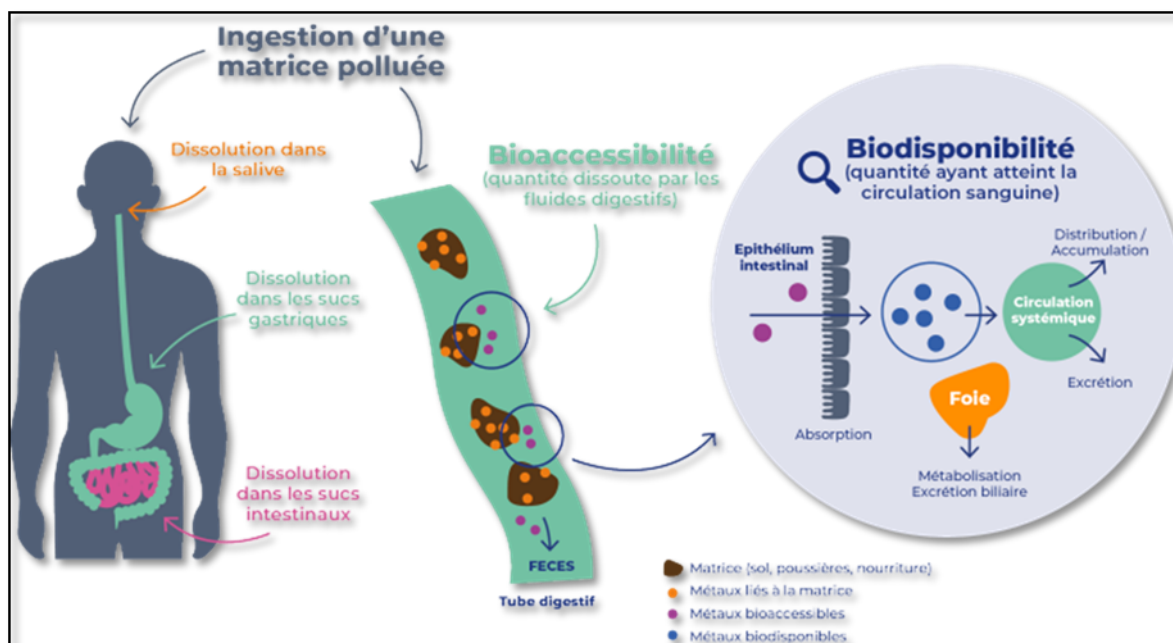


Figure I. 2. Schématisation des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité en cas d'ingestion d'une matrice contaminée (source : Eurofins Environnement France, 2023).

De nombreux protocoles ont été proposés pour évaluer la fraction bioaccessible des ETM et estimer leur potentiel de toxicité et leur impact sanitaire, notamment le test d'extraction basé sur la physiologie (PBET), le test Solubility Bioaccessibility Research Consortium (SBRC), le

Chapitre I. Synthèse bibliographique

test gastro-intestinal in vitro (IVG), Simplified Based Extraction Test (SBET) et la méthode unifiée de bioaccessibilité (UBM : Unified Barge Method) (Zheng *et al.*, 2022) (Tableau I.2). Ces protocoles permettent de déterminer les transferts possibles des ETM d'un compartiment à l'autre, jusqu'à la population humaine. La méthode UBM est capable de restituer avec précision la digestion gastro-intestinale humaine. Son application peut être élargie aux légumes, aux sédiments ou à tout autre substrat (Tokahioğlu, 2023). Ainsi, la compréhension du comportement des ETM dans le sol repose sur l'analyse conjointe de leur spéciation, de leur mobilité et de leur biodisponibilité, des paramètres étroitement interdépendants et fortement influencés par les conditions environnementales et physico-chimiques du sol.

Tableau I.2. Récapitulatif des protocoles, les plus couramment appliqués, de mesures in vitro de la bioaccessibilité des ETM

Méthodes	Segments	Composition des Solutions utilisées	Condition expérimentale	Références
Test PBET (Physiologically Based Extraction Test)	Phase gastrique	HCl, pepsine, citrate de sodium, sel disodique d'acide malique, acide lactique, acide acétique	pH : 1,8 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 1 h	Ruby <i>et al.</i> , 1996 Boros <i>et al.</i> , 2017
	Phase intestinale	Bicarbonate de sodium solide, sels biliaires, pancréatine	pH : 7 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 4 h	
Test UBM (Unified Barge Method)	Bouche/salive	KCl, NaH ₂ PO ₄ , KSCN, Na ₂ SO ₄ , NaCl, NaOH 1M, urée, amylase, mucine, acide urique	pH : 6,5 Ratio liquide : solide :1 :15 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 20 s - 5 min	Griggs <i>et al.</i> , 2021
	Phase gastrique	NaCl, NaH ₂ PO ₄ , KCl, CaCl ₂ , NH ₄ Cl, 37% HCl, glucose, acide glucuronique, urée, chlorhydrate de glucosamine, sérum bovin albumine (BSA), mucine, pepsine	pH : 1,2 Ratio liquide : solide :1 :100 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 1 h	
	Phase intestinale	NaCl, NaHCO ₃ , KH ₂ PO ₄ , KCl, MgCl ₂ , HCl, urée, CaCl ₂ , BSA, pancréatine, lipase	pH : 7,4 Ratio liquide : solide :1 :100 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 4 h	
Test SBET (Simplified Based Extraction Test)	Estomac	HCl, glycine	pH : 1,5 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 1 h	Ruby <i>et al.</i> , 1996 Griggs <i>et al.</i> , 2021
Test IVG (gastro-intestinal in vitro)	Phase gastrique	Pepsine, NaCl	pH : 1,8 Ratio liquide : solide : 1 :150 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 1 h	Ruby <i>et al.</i> , 1996 Griggs <i>et al.</i> , 2021
	Phase intestinale	Bile, Pancréatine	pH : 5,54 Ratio liquide : solide :1 :150 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 1 h	

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Test SBRC (Solubility Bioaccessibility Research Consortium)	Phase gastrique	Glycine	pH : 1,5 Ratio liquide : solide :1 :100 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 1 h	Griggs <i>et al.</i> , 2021
	Phase intestinale	Bile, Pancréatine	pH : 7 Ratio liquide : solide :1 :100 Température : 37°C ; Durée d'incubation : 4 h	

1.3. Facteurs influençant la mobilité des ETM dans les sols

La mobilité des ETM dans les sols est contrôlée par divers facteurs physicochimiques et biologiques.

1.3.1. Propriétés physico-chimiques du sol

Les propriétés physico-chimiques du sol sont l'un des facteurs les plus influents sur la mobilité des ETM dans le sol.

Le pH est un facteur clé. Il agit de manière directe et indirecte sur les processus de sorption/désorption, de précipitation/dissolution, de mobilité/immobilité, de formation de complexes et d'oxydoréduction (Bolan *et al.*, 2014). L'augmentation du pH favorise la déprotonation des complexes aqueux et des groupes fonctionnels superficiels des phases solides. En raison de la baisse de la quantité de protons, la concurrence entre les protons et les cations métalliques est plus faible et, par conséquent, les répulsions diminuent, accélérant la formation de nouvelles phases. Ainsi, la solubilité des cations métalliques diminue avec l'augmentation du pH. En revanche, la diminution du pH favorise la libération d'ions OH⁻ réduisant ainsi la compétition entre les anions et ces ions (OH⁻). Cela accélère la formation de nouvelles phases précipitées (Ahmed *et al.*, 2021). Ces phases permettent de limiter la mobilité des ETM.

La conductivité électrique (CE) peut influencer directement la mobilité des ETM dans le sol, en affectant leur solubilité. L'augmentation de la CE peut accroître la solubilité de certains éléments, formant des complexes métalliques plus solubles avec les ions présents dans la phase liquide du sol et par conséquent augmenter leur mobilité et leur transport vers l'écosystème. En outre, les ions majeurs tels que Na⁺ et Ca²⁺ du fait de leurs fortes concentrations peuvent entrer en concurrence avec les ions métalliques au niveau des sites de sorption sur les particules du sol, ce qui favorise la libération de certains ETM dans la solution du sol et, par conséquent, leur mobilité (Acosta *et al.*, 2011 ; Wei *et al.*, 2022).

La capacité d'échange cationique (CEC) désigne le pouvoir du sol à retenir et à échanger des cations. Elle dépend de sa composition minéralogique et organique, de son pH et de la nature du cation. La forte CEC garantit la rétention des cations métalliques sur les sites d'échange, ce qui réduit leur mobilité et, par conséquent, leur acheminement vers l'environnement. Les cations majeurs du sol, tels que Ca^{2+} , K^+ et Mg^{2+} , sont capables de saturer les sites d'échange de cations, ce qui facilite la mobilité des ETM même à forte CEC (Kolling *et al.*, 2025).

La matière organique, un autre paramètre, qui joue un rôle important dans la rétention des ETM dans le sol. En effet, elle contient de nombreux groupes fonctionnels capables de former des complexes moins solubles avec les cations métalliques, réduisant ainsi leur mobilité. Ces complexes organométalliques peuvent facilement être absorbés par les particules du sol telles que les oxydes et les argiles (Mensah & Amoakwah, 2024).

La texture du sol désigne la taille des particules du sol, un facteur déterminant de sa structure, sa porosité, sa perméabilité et, par conséquent, de sa capacité de retenir l'eau, ainsi que les éléments traces métalliques. Les sols argileux, riches en particules fines, se caractérisent par une surface spécifique et une CEC élevées, leur conférant une forte aptitude à retenir les cations métalliques tout en réduisant leur mobilité (Kumari & Mohan, 2021). En revanche, les sols sableux contiennent une grande proportion de particules grossières, présentent une surface spécifique et une CEC faibles, ce qui réduit leur capacité d'adsorption des cations métalliques et favorise la mobilité des ETM.

Le potentiel redox (Eh) est l'un des principaux facteurs environnementaux contrôlant la mobilité des ETM dans le sol. Il traduit les échanges d'électrons entre les espèces chimiques influençant ainsi le degré d'oxydation des éléments et leur capacité à se lier à différentes phases réceptrices. À titre d'exemple, l'As sous sa forme arséniate (As(V)) est plus mobile en conditions d'oxydation. En revanche, les faibles valeurs d'Eh diminuent l'état d'oxydation et entraînent la précipitation des métaux sous une forme sulfurée (ZnS et PbS), ce qui les rend plus difficiles à dissoudre et donc à se déplacer (Zhang *et al.*, 2023).

1. 3.3. Conditions climatiques

La température du sol est principalement liée à la météorologie et, par conséquent, à la climatologie. Elle a un effet direct et indirect sur la mobilité des éléments métalliques ; un effet direct, en modifiant certaines réactions chimiques tel que la dissolution-précipitation et la

coprécipitation, et un effet indirect, en changeant la teneur en eau du sol, le pH ou l'Eh (Qafoku, 2014).

La pluviométrie est un facteur hydraulique qui influe directement la mobilité des ETM dans le sol à travers la dissolution de sels métalliques solubles présents dans la phase solide du sol. Les fortes précipitations sont également capables de saturer le sol en eau, ce qui limite la circulation de l'oxygène et entraîne une baisse du potentiel d'oxydoréduction. Elles modifient indirectement le pH et la dynamique de la matière organique du sol, ainsi que l'activité microbienne (Zhang & Furman, 2021).

1.3.4. Activité biologique des sols

Les bactéries et les racines des plantes peuvent entrer en interaction avec les ETM par divers mécanismes (Pal *et al.*, 2022). Ainsi, les métaux peuvent être transformés par des réactions d'oxydation/réduction ou d'alkylation (Begum *et al.*, 2022). En général, ces réactions affectent la toxicité et la mobilité du métal d'origine. Les ETM peuvent également s'accumuler par adsorption passive, indépendamment du métabolisme, ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (bioaccumulation), réduisant ainsi la teneur des métaux dans la solution du sol. Ces microorganismes participent également aux cycles biogéochimiques et peuvent changer les propriétés de la matière organique dans le sol, engendrant des changements dans le comportement des métaux par des mécanismes de chélation ou de complexation (Pal *et al.*, 2022). Les micro-organismes peuvent favoriser également la précipitation des ETM sous forme insolubles tels que les sulfures et les oxydes (biominéralisation), ce qui réduit leur degré de mobilité (Begum *et al.*, 2022). En revanche, ils ont la capacité de modifier les conditions physico-chimiques du sol, entraînant la libération de métabolites organiques ou inorganiques capables de modifier la solubilité des polluants (Rahman & Singh, 2020).

1.4. Impacts des constituants du sol sur la dynamique des ETM

Les ETM sont présents dans les sols sous différentes formes chimiques et sont répartis entre les divers constituants solides et liquides du sol (Figure I.3). Leurs comportements dans le sol et la solution du sol varient en fonction des phases auxquelles ils sont liés et de leurs interactions. Certains restent incorporés dans les constituants du sol, ce qui limite leur mobilité entre les différents compartiments et leur bioaccumulation par les organismes vivants, tandis que d'autres sont absorbés et peuvent être transportés d'un compartiment à l'autre.

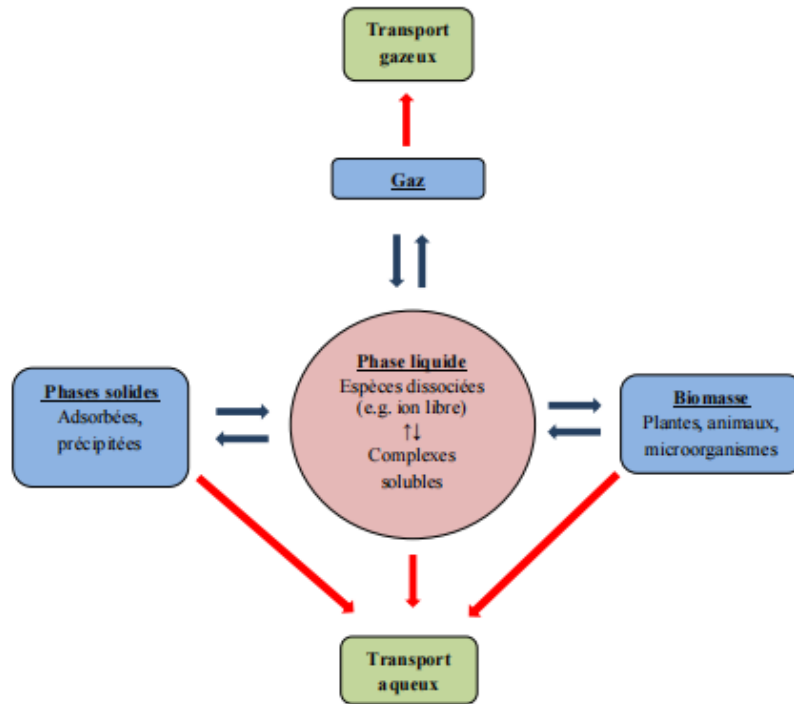


Figure I. 3. Dynamique des éléments traces métalliques dans le sol (d'après Mattigod *et al.* 1981).

1.4.1. Minéraux et complexes minéraux

- Les minéraux argileux sont des phyllosilicates résultant de l'altération de minéraux primaires silicatés tels que les feldspaths, les micas, les amphiboles, etc (Guin *et al.*, 2025). Ils ont une structure composée d'un empilement de feuillets élémentaires. Ces feuillets sont constitués de couches tétraédriques, c'est-à-dire d'atomes de silicium entourés d'atomes d'oxygène, et de couches octaédriques, qui sont des atomes d'aluminium et de magnésium entourés d'atomes d'oxygène et de groupements hydroxyles (Guin *et al.*, 2025). La succession de ces couches ainsi que l'espace interfoliaire (la distance séparant chaque feuillet) caractérisent les grandes familles de minéraux argileux : (1) les argiles de type 1/1 sont constituées par une couche tétraédrique liée à une couche octaédrique, comme la kaolinite et la serpentine ; (2) les argiles de type 2/1 sont constituées de deux couches tétraédriques entourant une couche octaédrique, telles que les illites, les vermiculites et les smectites ; (3) les argiles de type 2/1/1 ont la même structure que les argiles 2/1, mais

l'espace interfoliaire est rempli par une couche octaédrique de brucite ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), appelée les chlorites.

La charge de surface des minéraux argileux est généralement négative à cause de deux phénomènes distincts. Le premier est indépendant des conditions physicochimiques et résulte de substitutions isomorphes lors de la formation des couches d'argile (substitution de Si^{4+} par Al^{3+} dans les couches tétraédriques, et de Al^{3+} par Fe^{2+} ou Mg^{2+} dans les couches octaédriques). Le deuxième est dépendant des conditions physico-chimiques (principalement le pH) et il est dû aux ions oxygène insaturés situés au niveau du feuillet. Le pH conditionne ainsi la protonation de ces groupes hydroxyle. En dessous du pH_{PCN} (pH au point de charge nulle), la charge de surface positive des argiles permet d'attirer les anions par des forces électrostatiques, alors que les cations nécessitent des réactions chimiques pour être adsorbés (Yariv & Cross, 1979). Au-dessus du pH_{PCN} , la charge négative favorise l'adsorption électrostatique des cations, renforçant l'absorption des espèces chargées positivement de la solution du sol (Van Olphen, 1960). Le potentiel d'adsorption des argiles dépend également de leur capacité d'échange cationique et de leur surface spécifique.

- Les oxydes regroupent les précipités sous forme d'oxydes, d'hydroxydes ou d'oxyhydroxydes (Trivedi *et al.*, 2001). Ce sont des minéraux généralement présents dans la fraction granulométrique argileuse du sol, mais ils ne sont pas des phyllosilicates (Egli *et al.*, 2008). Ils peuvent être cristallisés ou amorphes. Les principaux oxydes sont le fer, le manganèse et l'aluminium. De même que les argiles, les oxydes et les hydroxydes ont une surface spécifique élevée. Ils sont également considérés comme des ligands pour les métaux. Dans les sols, la phase de rétention préférée de nombreux métaux et métalloïdes est constituée par les oxydes de fer et de manganèse, qui jouent un rôle majeur dans la sorption des ions métalliques (Shi *et al.*, 2021). La classification de ces oxydes a été établie en fonction de leur capacité d'adsorption, comme suit : oxydes de Mn > oxydes de Fe > oxydes d'Al (Trivedi *et al.*, 2001).

- Les carbonates sont présents dans les sols sous forme de calcite, dolomite, magnésite, carbonate de soude et sidérite. Ils occupent une place fondamentale dans les sols, grâce à leur équilibre de dissolution, qui régule en partie le pH (Geng *et al.*, 2022). Ils peuvent se trouver sous forme de particules fines, de concrétions, de nodules et d'encroûtements. La présence d'une forte teneur en carbonates confère au sol d'avoir un

caractère alcalin, favorisant divers modes de fixation des métaux (par précipitation et adsorption). Les surfaces carbonatées présentent des groupes hydroxyles et carbonyles capables de fixer les ions en solution. La calcite, étant le carbonate le plus couramment présent, subit une série de phénomènes de dissolution et de précipitation, aboutissant à la formation de carbonates secondaires (Luo *et al.*, 2022). Au cours de ce processus, les ETM peuvent être incorporés dans la structure des carbonates nouvellement formés.

- Les sulfates et les sulfures ont un effet antagoniste sur la dynamique des ETM dans le sol. En effet, les sulfates de plusieurs ETM tels que Cd, Zn, Cu se trouvent relativement solubles dans l'eau, notamment dans les sols acides. Par conséquent, la présence d'ions sulfates (SO_4^{2-}) peut favoriser la dissolution des ETM liés aux particules du sol, augmentant ainsi leur mobilité et leur biodisponibilité (Godirilwe *et al.*, 2024). Parfois, les sulfates peuvent réagir avec les ETM et former des minéraux secondaires, tels que les sulfates métalliques dans les sols sulfatés acides. Ces minéraux peuvent bloquer temporairement les ETM ou les libérer à nouveau en cas de changement des conditions physicochimiques du sol en particulier le pH, et le potentiel d'oxydoréduction. Ainsi, dans des conditions anaérobies les ETM ont une forte affinité avec S^{2-} et peuvent former des sulfures métalliques, qui sont très peu solubles dans l'eau (Xu *et al.*, 2024). Cette précipitation des sulfures métalliques constitue un mécanisme important d'immobilisation des ETM dans les sols.

1.4.2. Matière organique

La matière organique (MO) provient principalement de la décomposition des déchets d'origine végétale. Elle se caractérise par sa surface spécifique élevée et sa capacité de gonflement importante, qui lui permet de fixer l'eau et de libérer de petites molécules qui peuvent ensuite s'agréger aux substances humiques (Yang *et al.*, 2021). Grâce à leurs différents groupes réactifs, ces substances sont capables de lier les ions métalliques par complexation et par la formation de liaisons de coordination. La fixation des ETM sur la matière organique peut être considérée comme un processus d'échange ionique entre le proton H^+ et les ions métalliques sur les groupes fonctionnels acides. Cependant, l'augmentation du degré de sélectivité entre MO et certains métaux peut conduire à une liaison directe *via* la formation de complexes de sphère interne avec les groupes fonctionnels (Salehi, 2025).

1.4.3. L'eau interstitielle

Deux zones peuvent être identifiées pour représenter l'eau interstitielle du sol (Qasim, 2015). La première est située à proximité de la phase solide et représente la zone de réaction superficielle la plus importante du système dans le milieu poreux, mais également la zone de diffusion de la fraction mobile du soluté. La seconde est l'eau d'infiltration qui représente la zone d'eau libre et qui régit l'écoulement de l'eau et le transport des solutés dans les sols.

La phase liquide du sol se caractérise par une composition et une réactivité définie par les propriétés de l'eau entrante, et les flux de matière et d'énergie de la phase solide du sol, du système biologique et de l'atmosphère. La composition de l'eau interstitielle du sol permet de mieux évaluer la réactivité, la mobilité et la biodisponibilité des ETM que celle de la concentration totale ou des extraits de sol. Ce concept a mené à la mise au point de plusieurs méthodes qui tentent de prédire la distribution des ETM dans les différentes fractions solides du sol ainsi que leur spéciation dans la solution équilibrée avec ces phases solides. La porosité est le principal facteur définissant le rapport entre les différentes phases du sol (solide, liquide et gazeuse) (Laloui *et al.*, 2003).

1.4.4. Mécanismes d'interactions des ETM avec les constituants du sol

La rétention et les échanges des ETM au niveau de l'interface solide-liquide impliquent plusieurs mécanismes d'interaction physico-chimique : (1) l'adsorption (spécifique et non spécifique), (2) la précipitation, (3) la co-précipitation, (4) la complexation de surface et (5) l'échange ionique (Figure I.4).

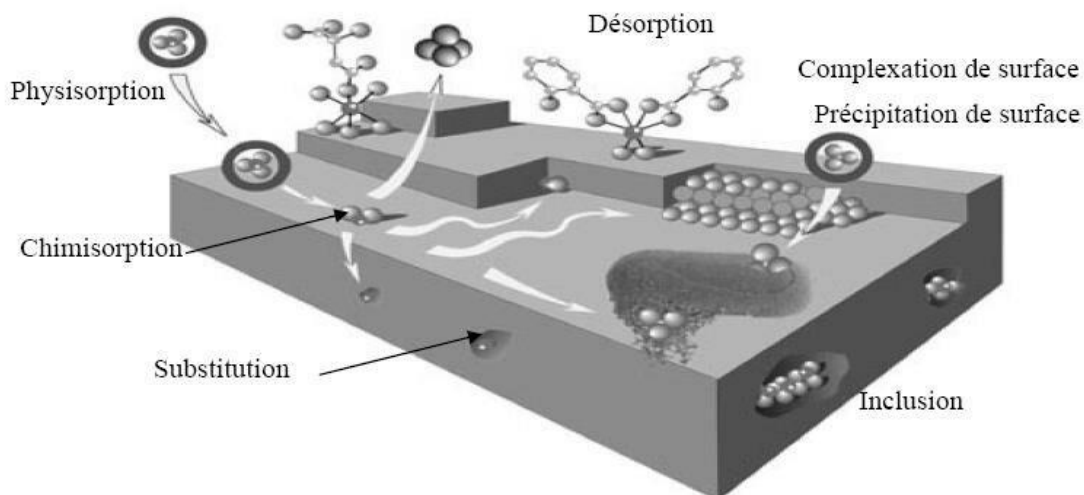


Figure I. 4. Les mécanismes de fixation des ETM dans le sol (adapté de Manceau *et al.* 2002 et repris de Deschamps *et al.* 2006).

L'adsorption est la liaison de la matière à l'interface solide-liquide et constitue la base de la plupart des processus d'interface (Sposito, 1989). On distingue généralement deux mécanismes d'adsorption : *i*) l'adsorption physique non spécifique ou physisorption qui représente la liaison du soluté à la surface d'un adsorbant polarisé. Cette liaison peut être créée via les faibles forces électrostatiques de type Van Der Waals ou Coulombien, sans modification de la structure moléculaire. Les cations chargés positivement sont ainsi attirés par les charges négatives de la surface du sol, telles que les composants argileux (chlorite, illite, smectite) (Majone *et al.*, 1996), les oxydes (Martínez & McBride, 1998) et les substances humiques (Hatira *et al.*, 1990). Ce mécanisme est facilement réversible (Manceau *et al.*, 2002) et dépend de la diffusion, de la stoechiométrie et de la capacité d'adsorption des ions et *ii*) l'adsorption chimique spécifique ou chimisorption est une forte liaison chimique, sans molécule d'eau intercalée entre les cations métalliques et un atome du substrat. Ce mécanisme conduit à la formation de complexes de sphère interne. Les métaux ont beaucoup moins de chances d'être mobilisés. Le complexe de la sphère interne comporte des liaisons ioniques, des liaisons covalentes ou une combinaison des deux, qui sont plus stables que les liaisons électrostatiques de la sphère externe (Zhou & Haynes, 2010).

La précipitation et la co-précipitation sont parmi les principaux mécanismes de rétention des métaux traces dans les sols (Sposito, 1989). La précipitation se produit à la surface des phases solides du sol ou dans la solution du sol. Les phases solides reflètent ce phénomène par une

augmentation de la surface du solide ou par la formation d'un nouveau solide à l'interface solide/liquide dans une disposition tridimensionnelle. La co-précipitation désigne la précipitation simultanée d'un élément chimique avec d'autres éléments (Kolthoff, 2002). Cette substitution est favorisée si la taille et la valence de l'élément substituant sont comparables à celles de l'élément substitué. La précipitation et la co-précipitation sont des mécanismes réversibles pouvant intervenir à la fois dans la rétention et la désorption des métaux à l'état de traces. Le pH, la concentration des ETM en solution, la température et le potentiel d'oxydoréduction influencent ces deux mécanismes. Les ETM sont ainsi précipités sous l'effet de ces facteurs et se présentent sous la forme de carbonates, de sulfures, de phosphates ou d'hydroxydes.

La complexation est définie par le regroupement des cations métalliques et des groupes fonctionnels des substances humiques. La complexation des ions métalliques avec la matière organique constituant le sol est définie par le regroupement des cations métalliques et des groupes fonctionnels des substances humiques. D'après la théorie acide-base de Lewis, l'acide est le récepteur d'une paire d'électrons tels que O, N et S, fournie par la base. Cette dernière est appelée ligand, et peut établir des liaisons de coordination avec les acides métalliques. Il existe deux types de ligands dans les sols : *i*) les ligands organiques qui sont des acides humiques et fulviques solubles et *ii*) les ligands inorganiques qui sont les carbonates, les phosphates et les sulfates peu solubles. Les métaux tels que Zn, Pb et Cd et les métalloïdes comme As et Sb peuvent créer des complexes avec divers ligands organiques et inorganiques présents dans la phase aqueuse du sol (Mafakheri *et al.*, 2024).

L'échange ionique est défini comme étant un processus réversible. Au cours de ce processus, une espèce ionique d'un composant solide est échangée avec une autre espèce ionique provenant d'une solution aqueuse en contact avec ce solide (Abe, 2021). Ce mécanisme se produit sans modification substantielle de la structure du solide. De plus, les ions impliqués doivent avoir la même charge. La matière organique et les argiles sont les principaux échangeurs d'ions dans le sol (Kumari & Mohan, 2021).

1.5. Impacts des ETM sur l'environnement et la santé humaine

Les ETM présentent des risques non négligeables, même à faibles doses. Ils sont non biodégradables, persistent longtemps dans l'environnement et peuvent s'accumuler dans les

organismes vivants. En raison des activités humaines telles que l'exploitation minière et de certains phénomènes naturels tels que l'altération des roches, leur impact nocif sur l'environnement et les êtres vivants a considérablement augmenté, faisant d'eux l'un des principaux défis à relever. La présence de ces polluants dans le sol constitue une chaîne cyclique de contamination (Figure I.5).

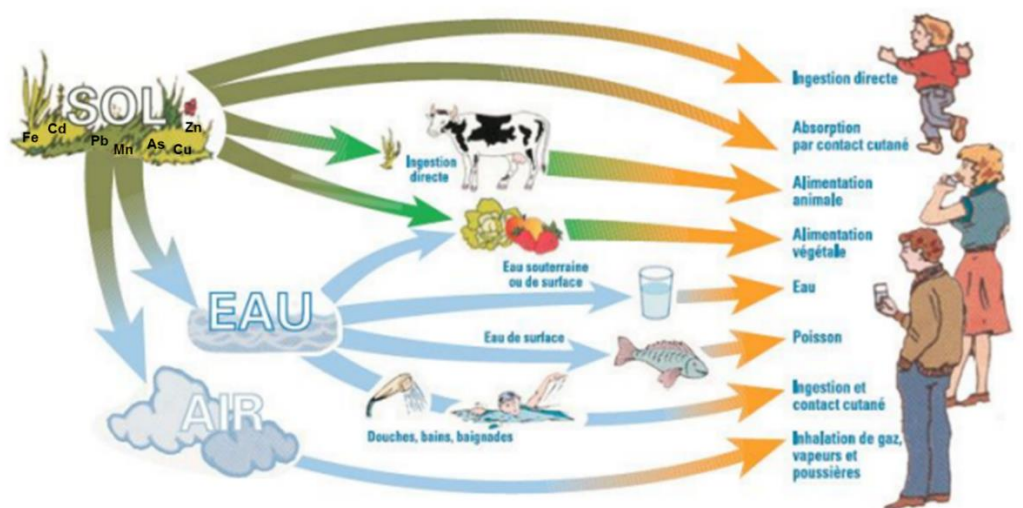


Figure I. 5. Chaîne cyclique de contamination par les ETM (source : INERIS).

➤ Effets des ETM sur l'environnement

De nombreux facteurs, tels que la source, la concentration, le type de métal, la forme chimique, la composition et le pH du sol influencent la toxicité des ETM pour les écosystèmes. Sur le sol, ces polluants peuvent modifier la diversité, la quantité et la fonction des populations microbiennes, ainsi que la structure génétique des microorganismes (Sazykin *et al.*, 2023). La présence des ETM en excès peut altérer également la structure des acides nucléiques, endommager les membranes cellulaires, perturber les fonctions cellulaires, inhiber l'activité enzymatique et affecter la production d'énergie, entraînant ainsi l'oxydation des lipides et la détérioration des protéines, modifiant la morphologie, le métabolisme et la croissance des microorganismes (Xie *et al.*, 2016). Ils sont également nocifs au biote du sol en perturbant les processus microbiens clés, ce qui entraîne une réduction de son activité et du nombre de bactéries. À long terme, ils augmentent la tolérance des populations bactériennes et fongiques,

comme les mycorhizes à arbuscules qui jouent un rôle primordial dans le renouvellement des écosystèmes pollués (Riaz *et al.*, 2021). Davantage, la contamination des sols par les ETM limite la croissance et la survie des espèces végétales, ce qui entraîne des problèmes nutritionnels, écophysiologiques et évolutifs. Dans l'écosystème aquatique, les ETM perturbent son équilibre, entraînant une réduction des variétés d'organismes aquatiques en fonction du degré de pollution (Bashir *et al.*, 2020). Une fois libérés dans ce milieu, les ETM prennent généralement la forme de particules, qui finissent par se déposer dans les sédiments où ils ont un effet néfaste sur les microorganismes. Les diatomées, par exemple, peuvent être modifiées par l'augmentation des niveaux des ETM dans les rivières (Lobo *et al.*, 2016). Sur la faune terrestre, les ETM représentent également un risque important. Ils peuvent s'accumuler dans les organes des animaux tels que le foie, les poumons et les reins, induisant des déséquilibres nutritionnels, des maladies métaboliques et des troubles hormonaux (Irshad *et al.*, 2021), perturbant ainsi leur santé, leur reproduction, leur comportement et leur rôle au sein de l'écosystème. Ainsi, l'exposition de la chaîne alimentaire aux polluants peut entraîner des risques sanitaires pour la population humaine.

➤ Effets des ETM sur la santé humaine

Bien que certains éléments soient indispensables pour les processus physiologiques, en tant que cofacteurs d'enzymes, oligo-éléments, régulateurs de la pression osmotique et stabilisateurs de molécules dans le corps humain tels que le Fe, le Zn, et le Mn, la plupart des ETM n'ont aucune activité biologique connue et peuvent même être toxiques lorsqu'ils sont présents en quantités excessives (Fulke *et al.*, 2024). En outre, certains métaux et métalloïdes, tels que Cd, Pb et As présentent un risque important même à faible concentration (Zhao *et al.*, 2024). La pénétration des ETM dans le corps humain peut se faire par différentes voies, telles que l'absorption, le contact avec la peau et l'inhalation. Les ETM qui s'accumulent dans le corps peuvent présenter des risques sanitaires, ce qui entraîne une série de maladies légères à graves (Figure I.6). Ils peuvent se fixer sur les molécules de protéines, ce qui empêche la réplication de l'ADN et la division cellulaire. L'exposition modérée de Pb et de Cd peut entraîner des effets toxiques affectant en particulier le système nerveux central, les poumons et les os (Leal *et al.*, 2023). L'exposition à l'arsenic peut entraîner le diabète, des maladies pulmonaires et cardiovasculaires. Il est responsable également de la maladie du pied noir, une grave maladie des vaisseaux sanguins entraînant la gangrène (Chen *et al.*, 1988). Cependant, l'exposition au mercure reste

Chapitre I. Synthèse bibliographique

un sujet de discussion d'un point de vue clinique (Zhao *et al.*, 2022). Par ailleurs, le degré de nocivité du mercure dépend de sa forme chimique, de sa concentration ainsi que du taux d'exposition. L'exposition aux sels mercuriques entraîne principalement des dommages à la muqueuse de l'intestin et des reins (Charkiewicz *et al.*, 2025). Le zinc peut causer l'infertilité et des troubles rénaux, le cuivre peut entraîner la dépression tandis que le chrome peut provoquer des tumeurs dans les organes respiratoires (Leal *et al.*, 2023). L'accumulation de fer au niveau du cerveau est associée à des maladies neurologiques, plus précisément Alzheimer, et peut également conduire à des maladies cardiovasculaires, à la carcinogenèse et à la croissance de bactéries pathogènes (Peng *et al.*, 2021).

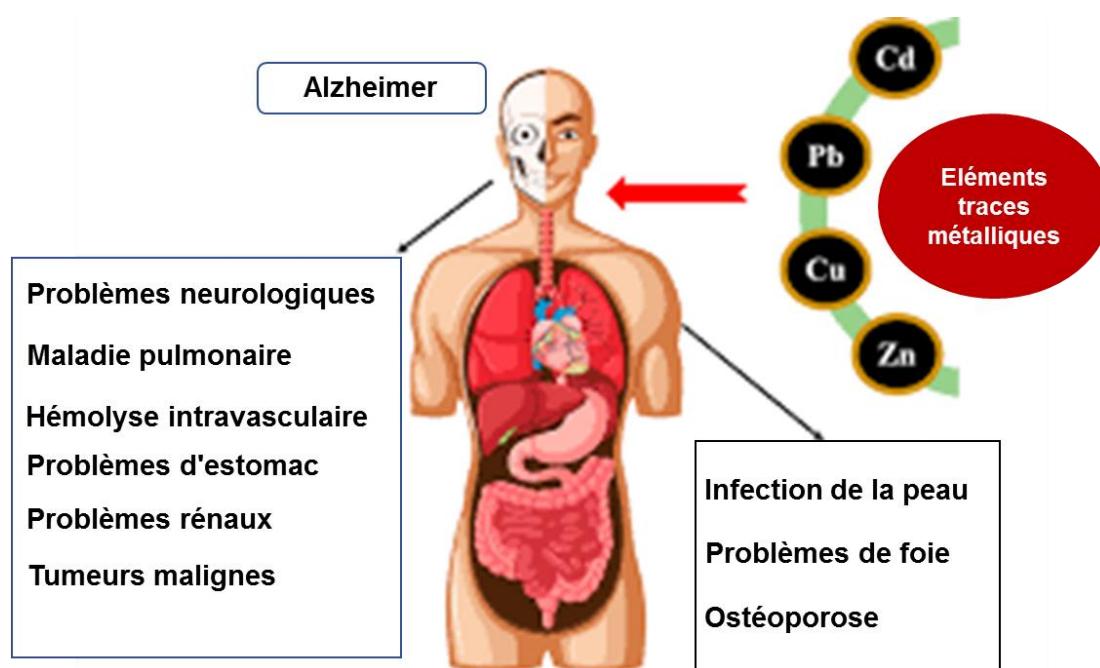


Figure I. 6. Impacts de la toxicité des éléments traces métalliques sur la santé humaine (adapté d’Aziz *et al.* 2023).

Face à ces enjeux, diverses stratégies de remédiation ont été proposées afin de minimiser ces impacts environnementaux et sanitaires associés.

2. Stratégies de remédiation

La dépollution ou la remédiation des sols est une stratégie qui permet de réduire, d'éliminer ou de stabiliser les polluants présents dans les sols. L'objectif de cette stratégie est de restaurer les sites contaminés en réduisant à la fois la toxicité des contaminants, en particulier les ETM, et

leur transport vers les zones voisines via l'érosion et le ruissellement des eaux, tout en assurant la protection de l'environnement et de la santé humaine.

En effet, les sites miniers sont souvent prioritaires pour la remise en état de l'environnement. Ce secteur est l'une des principales sources de contamination métallique. Afin de minimiser ses impacts, diverses méthodes de remédiation sont mises en œuvre (Figure I.7) : (1) les méthodes physiques visent à retenir ou à stabiliser les ETM afin de limiter leur dispersion ; (2) les méthodes chimiques visent à extraire et/ou à convertir les ETM en formes moins nocives (El Rasafi *et al.*, 2021). Ces deux méthodes (physico-chimiques) exploitent les propriétés physiques, chimiques ou électriques du milieu contaminé ou des polluants eux-mêmes afin de dégrader ou modifier leurs caractéristiques facilitant ainsi leur élimination (Liu *et al.*, 2024). Bien que rapides, ces techniques présentent des inconvénients majeurs, notamment un coût élevé et une altération significative des propriétés du sol et des eaux souterraines ; (3) les méthodes biologiques font appel à des plantes et/ou à des micro-organismes pour absorber ou immobiliser ces contaminants (El Rasafi *et al.*, 2021).

Cependant, les méthodes traditionnelles sont souvent insuffisantes pour traiter les divers polluants présents dans les sols miniers, les approches combinées d'assainissement offrent une solution plus efficace et durable (El Rasafi *et al.*, 2021). Afin d'optimiser ces approches, certains procédés se concentrent sur la stabilisation des métaux ou métalloïdes dans le sol en utilisant des amendements organiques ou minéraux.

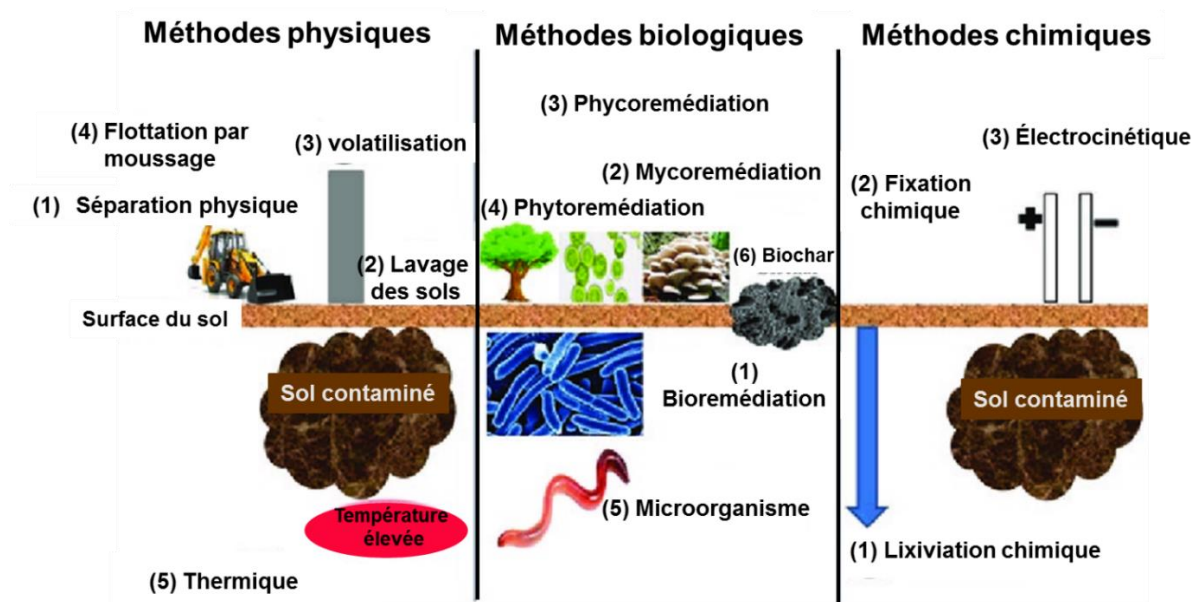


Figure I. 7. Les différentes techniques de remédiation des sols : les numéros correspondent aux différentes approches de chaque méthode ; + : anode ; et - : cathode (adapté de Koul & Taak, 2018).

2.1. Stabilisation – immobilisation des ETM

La mobilité des ETM dans les sols contaminés représente un paramètre déterminant dans l'évaluation des risques environnementaux, en raison de son potentiel de diffusion dans les écosystèmes adjacents. Dans ce contexte, les techniques de stabilisation se positionnent comme une approche prometteuse visant à minimiser la biodisponibilité de ces éléments par transformation en phases minérales stables présentant une solubilité réduite (Cui *et al.*, 2023a).

2.1.1. Rôles des amendements minéraux dans la stabilisation des ETM

Les amendements minéraux sont des composés inorganiques incorporés aux sols contaminés afin de minimiser la mobilité et la biodisponibilité des ETM. Ces composés peuvent précipiter ces contaminants sous des formes insolubles, en ajustant le pH et/ou en adsorbant les polluants, diminuant ainsi leur toxicité et leurs diffusions dans l'environnement (Lwin *et al.*, 2018).

Les oxydes métalliques sont des minéraux, présentant une forte capacité de sorption due à leur grande surface spécifique et à leur réactivité chimique. Ils peuvent également piéger les ETM, contribuant ainsi à réduire leur solubilité dans le sol. Ils sont reconnus en particulier pour leur pouvoir à réduire la mobilité de l'As (Michálková *et al.*, 2016). Ces oxydes métalliques sont capables de lier fortement les métaux et les métalloïdes par sorption, coprécipitation et formation de complexes de la sphère interne, tels que le Zn, le Cu et le Pb avec l'oxyde (oxyhydroxyde) de fer biogènes (Whitaker & Duckworth, 2018 ; Lwin *et al.*, 2018).

Parmi les mécanismes d'adsorption spécifiques figurent les processus de complexation de surface, qui sont des réactions entre les ions métalliques en solution et les groupes fonctionnels de la surface. Les groupes -OH des surfaces minérales, généralement chargés négativement (Zhang *et al.*, 2023b) à pH élevé et positivement à pH faible, constituent le siège de ces réactions (Sung *et al.*, 2011). À faible pH, de nombreux oxydes possèdent donc une charge superficielle positive, entraînant l'adsorption d'anions tels que l'As(V) (Mukhopadhyay *et al.*, 2021). Ainsi, les concentrations d'As dans les lixiviats des sols pollués seront considérablement réduites par l'application de goethite, d'oxydes de fer et de sulfates de fer. Cependant, ils perdent leur potentiel à adsorber efficacement les cations métalliques tels que le Cd^{2+} et Pb^{2+} . Les oxydes favorisent ainsi leur libération dans la solution du sol et, par conséquent, augmentent leur mobilité. Par ailleurs, la complexation de ces oxydes avec les acides humiques et fulviques ou leur réduction dans des conditions anoxiques permettent de les solubiliser partiellement. Ainsi, la co-précipitation permet également l'immobilisation des ETM dans le sol contaminé, en formant des minéraux moins solubles (Li *et al.*, 2021).

Les minéraux carbonatés, tout comme les oxydes métalliques, peuvent être utilisés également comme stabilisateur des ETM dans le sol grâce à leur capacité à réduire leur mobilité et ainsi leur toxicité. Ils peuvent stabiliser ces contaminants dans le sol via divers mécanismes, notamment : la précipitation sous forme de carbonates métalliques ; l'augmentation du pH ; l'adsorption directe et la complexation (Yuan *et al.*, 2023 ; Kim *et al.*, 2023). Toutefois, leur efficacité pour fixer les ETM dépend à la fois des éléments en question et des conditions environnementales.

Les minéraux phosphatés participent de manière significative à l'immobilisation des ETM dans les sols contaminés. Leur association avec des champignons solubilisants le phosphate augmente la disponibilité du phosphore, favorisant ainsi la formation de phosphates métalliques peu solubles. Ce processus repose sur la capacité des composés phosphatés à précipiter les métaux sous forme de phosphates métalliques insolubles, tels que la pyromorphite pour le plomb, ce qui réduit nettement la solubilité de ce métal (Park, 2012). Le calcium continu de l'hydroxyapatite minérale phosphatée qui peut être échangé avec les ions métalliques dans une solution aqueuse. Le calcium de l'hydroxyapatite peut ainsi remplacer les ETM absorbés sur des surfaces minérales telles que la calcite (Gibert *et al.*, 2021). Toutefois, les minéraux phosphatés présentent un fort potentiel d'immobilisation des ETM, leur faible solubilité dans

certaines conditions peut limiter leur efficacité et poser des contraintes environnementales (Zhang *et al.*, 2021b).

Bien que les amendements minéraux offrent un potentiel important pour la stabilisation des ETM, il existe d'autres méthodes prometteuses, telles que la stabilisation avec des amendements organiques.

2.1.2. Rôle des amendements organiques dans la stabilisation des ETM

Face aux limites techniques de la stabilisation classique des ETM, les amendements organiques apparaissent comme une approche prometteuse pour immobiliser ces polluants et améliorer la fertilité du sol. Dans ce contexte, le compost et le biochar figurent parmi les amendements fréquemment mentionnés pour la stabilisation ETM (Santos *et al.*, 2024).

Le compost est le produit de la dégradation aérobie des déchets organiques, il permet d'améliorer les propriétés chimiques du sol en augmentant le pH, la CEC, et le pouvoir tampon (Khadim *et al.*, 2024). La matière organique présente dans le compost a la capacité de stabiliser les agrégats, contribuant ainsi à la formation des pores nécessaires au transport de l'eau et de l'air dans le sol. Cette amélioration de la porosité contribue directement à l'optimisation de la structure du sol et à l'augmentation de sa fertilité (Guo *et al.*, 2019). Lorsqu'il est incorporé dans le sol, le compost, grâce à sa biomasse microbienne active et ses polysaccharides, contribue à la stabilisation des agrégats. Ces composants organiques renforcent la cohésion des particules du sol, améliorant ainsi sa structure et réduisant ainsi les risques d'érosion et de compactage (Raj *et al.*, 2023). Il peut augmenter également la diversité microbienne du sol en apportant de la nourriture aux organismes hétérotrophes. Bien que le compost exerce des effets positifs tant sur la structure du sol que sur sa fertilité, il peut également influencer la mobilité et la biodisponibilité des ETM présents dans les sols. Il peut en effet influencer diverses caractéristiques du sol, telles que le pH, la CE, la CEC, et le taux d'humification ainsi que la texture du sol (Mehmood *et al.*, 2021). En effet, des études ont montré que l'ajout de compost à des sols contaminés peut augmenter la mobilité de l'arsenic (Mensah *et al.*, 2022 ; Mehmood *et al.*, 2021). D'autres études ont également révélé sa capacité à agir comme un biosorbant pour les ETM (Palupi *et al.*, 2024; Maumela & Serepa-Dlamini, 2024).

Le biochar est une matière organique carbonisée qui se forme à haute température et à faible teneur en oxygène (Blenis *et al.*, 2023). Il peut être fabriqué de manière traditionnelle (une fosse dans le sol, dont le fond est recouvert d'une couche de terre pour limiter le contact avec

l'oxygène) ou à l'aide de systèmes de pyrolyse modernes sous condition anaérobie. Il présente diverses caractéristiques pour l'immobilisation des ETM notamment :

(1) Le biochar possède une grande surface spécifique : *i)* permettant de retenir les ions métalliques dans ses sites d'absorption, *ii)* réduisant leurs mobilités dans la solution du sol (Abideen *et al.*, 2024 ; Blenis *et al.*, 2023), et *iii)* améliorant l'absorption des nutriments et par conséquent la capacité d'échange cationique (Tauqeer *et al.*, 2021) ;

(2) Il est caractérisé par une structure très poreuse : *i)* améliorant la capacité du sol à conserver l'humidité pour aider les plantes et les microorganismes à survivre à la sécheresse liée au stress oxydatif et *ii)* permettant également de stocker les éléments nutritifs, et d'améliorer leur accessibilité aux plantes (Alkharabsheh *et al.*, 2021 ; Ahmad *et al.*, 2025) ;

(3) Il possède une charge négative grâce à sa nature carbonée, lui permettant de : *i)* capter les cations présents dans le sol comme le magnésium (Mg^{2+}), le calcium (Ca^{2+}), et le potassium (K^+) (Li *et al.*, 2023 ; Abideen *et al.*, 2024), et *ii)* d'augmenter également sa capacité d'échange cationique (Chai *et al.*, 2024 ; Jatav *et al.*, 2021). Le biochar renforce ainsi la disponibilité et la conservation des nutriments dans le sol, ce qui réduit leur possibilité de lessivage et favorise le développement des plantes (Ahmad *et al.*, 2025) ;

(4) Il possède une capacité d'échange cationique élevée : *i)* favorisant la rétention et l'immobilisation des ETM cationiques (Tauqeer *et al.*, 2021), *ii)* diminuant ainsi leur biodisponibilité et leur lixiviation vers les eaux souterraines et *iii)* atténuant éventuellement leur effet néfaste sur les végétaux et l'environnement (Blenis *et al.*, 2023) ;

(5) Il contient des substances plus alcalines (carbonates et oxydes) : *i)* améliorant les échanges d'ions alcalins et le pH du sol ; *ii)* favorisant la précipitation des éléments traces sous formes moins solubles tels que les hydroxydes, les phosphates et les carbonates (Wang *et al.*, 2022 ; Hasan *et al.*, 2024) ; et *iii)* améliorant la qualité du sol et réduisant la biodisponibilité des ETM (Mensah *et al.*, 2022).

Récemment, plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation du biochar en tant qu'amendement organique rentable en raison des caractéristiques physicochimiques. Ces dernières lui confèrent un rôle primordial dans l'amélioration de la qualité du sol des sites contaminés et l'immobilisation des ETM (Tableau I.3). Ainsi, le biochar possède divers mécanismes d'adsorption et d'immobilisation des ETM.

En effet, la forte affinité vis-à-vis des ions métalliques et les sites de forte absorption du biochar permettent d'adsorber ces ions présents dans le sol (Bortoloti & Baron, 2022). La complexation des ETM sur la surface du biochar et les pores intérieurs a une influence vitale sur les groupements fonctionnels primaires tels que la cétone et le pyrone ou acides tels que les groupes carboxyliques, hydroxyliques, et phénoliques (Gęca *et al.*, 2023 ; Hasan *et al.*, 2024) (Figure I.8). Par exemple, le biochar d'Eucalyptus qui peut interagir avec les cations métalliques via ses groupes fonctionnels présents à sa surface. Grâce à des liaisons d'hydrogène, des échanges ioniques et des interactions électrostatiques, il réduit ainsi la biodisponibilité des ETM dans le sol (Shafiq *et al.*, 2021).

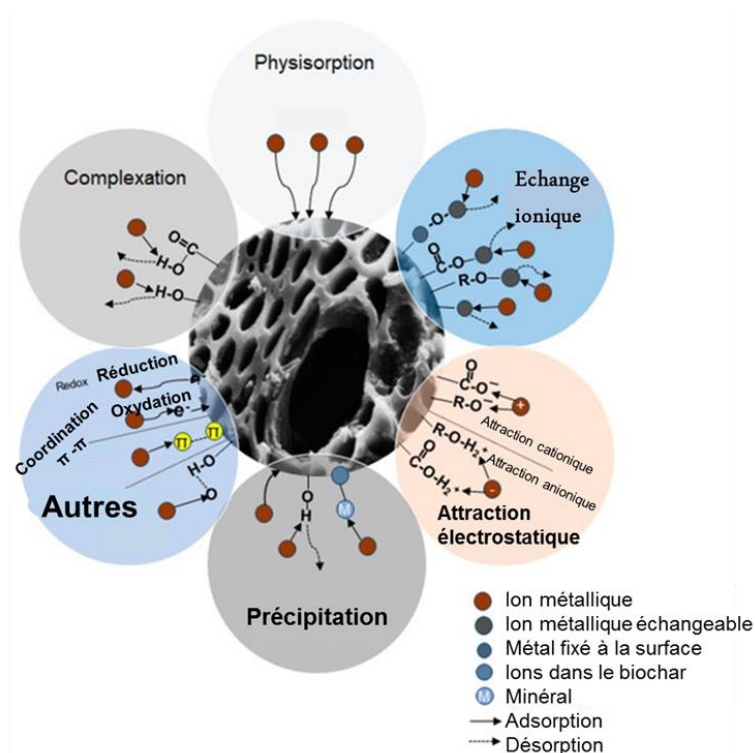


Figure I. 8. Les différents mécanismes d'adsorption et d'immobilisation des ETM dans les sols par le biochar (adapté de Hasan *et al.*, 2024).

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Tableau I.3. Exemples d'études montrant l'efficacité du biochar dans la stabilisation des ETM

Type de biochar	ETM	Effets observés	Références
Paille de blé	Cd	Augmentation du pH du sol ; Réduction de la mobilité de Cd ; Réduction de la concentration de Cd disponible de 2,19 % et 15,89 % ;	Han <i>et al.</i> , 2022
Tiges de coton	Cd	Augmentation du pH du sol de 1,32 ; Diminution de la concentration disponible de 71 % ; Réduction de niveau de Cd dans l'eau interstitielle du sol de 95 % ;	Jia <i>et al.</i> , 2022
Fumier de porc	Zn, Cu	Réduction des risques environnementaux ; Transformation de Zn et Cu en formes plus stables ; Diminution des risques écologiques potentiels de 46,3 à 4,8 ; Durabilité de l'immobilisation de Zn et Cu ;	Lee <i>et al.</i> , 2024
Paille de soja	Pb	Immobilisation de Pb ; Formation de phases cristallines stables de plomb ; Formation de minéraux stables (hydroxyapatite plombique, chloropyromorphite, phosphate et sulfate de plomb) ;	Tian <i>et al.</i> , 2025
Canne de maïs	As, Cd	Amélioration des caractéristiques du sol ; Immobilisation de As via l'adsorption sur le biochar, changement d'état d'oxydation et chélation avec les groupes fonctionnels du biochar ; Immobilisation de Cd via l'échange ionique avec les cations du biochar et la coprécipitation ; Réduction de la stabilisation de Cd et As avec l'augmentation de la dose de biochar ;	Ma <i>et al.</i> , 2025
Boue municipale	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Stabilisation de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, et Zn ; Réduction de la forte mobilité des métaux ; Diminution des risques environnementaux ;	Zhao <i>et al.</i> , 2024
Paille	Pb	Amélioration de la qualité du sol en augmentant le pH, la CEC, et la matière organique ; Immobilisation de Pb ; Stabilisation durable de Pb ;	Li <i>et al.</i> , 2025b

Le biochar se distingue par sa surface spécifique élevée, ce qui favorise l'adsorption des substances labiles, influençant ainsi l'activité enzymatique du sol. En effet, les substrats et les enzymes extracellulaires se lient aux groupes fonctionnels présents à sa surface ce qui peut moduler les activités enzymatiques du sol (de façon négative ou bien positive), telles que l'uréase, phosphatase, β -glucosidase. Ces enzymes, qui sont des indicateurs de la santé du sol, jouent un rôle crucial dans les cycles de N, C, et P (Maphuhla *et al.*, 2022 ; Zhang *et al.*, 2021a). Le biochar développe un milieu favorable aux micro-organismes qui sécrètent les enzymes dans le sol (Azad *et al.*, 2022). Ces enzymes sont ainsi capables d'interagir avec les groupes fonctionnels du biochar, ce qui améliore leur stabilité et leur activité (Amalina *et al.*, 2022 ;

Gorovtsov *et al.*, 2020). L'augmentation des activités enzymatiques dans le sol contaminé permet d'améliorer la production des ligands tels que les sidérophores, les polysaccharides et les acides organiques. Ces ligands possèdent des groupes chimiques capables de lier les ions métalliques, favorisant ainsi leur chélation et par conséquent réduisant leur biodisponibilité (Zhu *et al.*, 2022, Haider *et al.*, 2022). Malgré les nombreux avantages de l'application du biochar dans les sols contaminés, elle présente également certaines limites. L'amendement du sol par le biochar peut nuire au développement des vers de terre et des champignons (Cui *et al.*, 2023b). Ayaz *et al.* (2021) ont montré également que le biochar peut réduire la croissance de la partie racinaire de certaines plantes comme le riz et la tomate. L'augmentation de $\text{NH}_4\text{-N}$ dans le sol lié à l'application du biochar entraîne également un stress oxydatif pour les plantes (Shi *et al.*, 2020). En outre, Kocsis *et al.* (2020) ont montré que la forte dose du biochar (10 %, m/m) peut immobiliser les nutriments dans le sol, ce qui limite la croissance des plantes.

Bien que l'application du biochar dans le sol soit adaptée à de nombreux endroits dans le monde tels que l'Europe, la Chine, l'Inde et l'État Unis, il convient de prendre en considération l'efficacité de son application à grande échelle et sur une longue période. Les dangers sanitaires liés à l'utilisation et à la production du biochar ne doivent pas être oubliés tels que les intoxications au monoxyde de carbone, les maladies pulmonaires, les troubles respiratoires, l'asthme, et les maladies cardiovasculaires (Idowu *et al.*, 2023) et doivent être pris en considération, afin de permettre au biochar d'être une meilleure alternative aux autres méthodes de restauration des sols contaminés à l'avenir.

2.2. Phytoremédiation : principes, et efficacité

La phytoremédiation est une approche de bioremédiation, qui fait l'objet d'une attention particulière en raison de ses caractéristiques écologiques et économiques (D'Souza & Paul, 2014 ; Sabreena *et al.*, 2022). Cette approche verte est basée sur la capacité des espèces végétales adaptées à restaurer les sols, l'eau et l'air contaminés. Elle peut limiter les dommages causés par les ETM aux écosystèmes et à la santé humaine grâce à différents mécanismes sans utilisation de produits chimiques (Figure I.9).

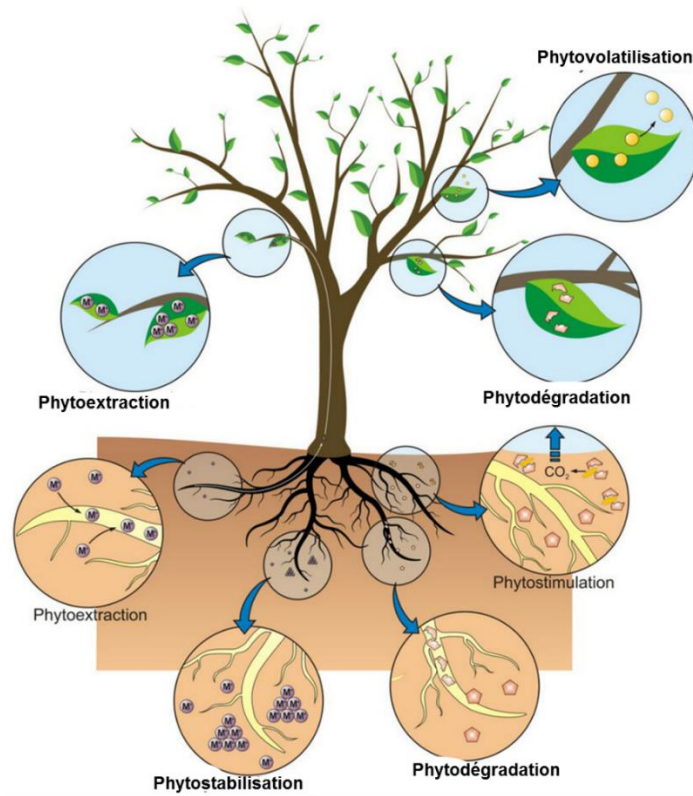


Figure I. 9. Principaux mécanismes de phytoremédiation (adapté de D'Souza & Paul, 2014)

La **phytodégradation** ou la phytotransformation correspond à la décomposition (métabolisation) ou la minéralisation des polluants organiques au sein des cellules végétales grâce à la sécrétion des enzymes spécifiques telles que les nitroréductases pour dégrader les composés nitroaromatiques, les déhalogénases spécifiques pour les solvants chlorés et les pesticides, et les laccases pour dégrader les anilines (Sabreena *et al.*, 2022). Ariyakanon (2023) a montré que *Pteris vittata*. L est une espèce capable d'absorber l'As dans le sol et de transformer en As^{3+} , tandis que *Echhornia carassipes* a le pouvoir de dégrader les contaminants organiques dans les milieux aquatiques. *Helianthus annuus* est une espèce efficace pour dégrader certains hydrocarbures pétroliers dans le sol contaminé (Park *et al.*, 2011 ; Bello *et al.*, 2022).

La **phytoextraction** ou la phytoaccumulation est une approche caractérisée par l'absorption des contaminants par les racines, puis leur translocation et leur accumulation dans les parties aériennes de la plante. Elle est principalement applicable aux ETM tels que le cadmium, le zinc, le plomb mais peut aussi être efficace pour les métalloïdes et les composés organiques. Les

plantes hyperaccumulatrices, qui ont la capacité de stocker des concentrations élevées de métaux spécifiques dans leurs parties aériennes, sont particulièrement préconisées dans le cadre de cette approche. Pathak & Bhattacharya (2021) ont montré que *Jatropha curcas*, *Amaranthus viridis* et *Ipomoea* sont des espèces efficaces pour extraire le Pb et le Cd. Ali *et al.* (2021) ont montré que *Brassica napus* et *Brassica juncea* ont une forte capacité à extraire le Pb et le Cr. *Lactuca sativa* est une espèce efficace pour le Ni, le Ca et le Fe (Hernández *et al.*, 2019). Pour les espèces ligneuses on cite particulièrement les peupliers et les saules, qui sont adaptés à la technique de phytoextraction et qui se caractérisent par leur croissance rapide et leur importante biomasse (Pajević *et al.*, 2016). Le choix des plantes destinées à la phytoextraction est dicté par une forte accumulation de ETM, une tolérance aux métaux, avoir une croissance rapide et une capacité à s'adapter aux conditions du site ou du sol contaminé.

La **phytovolatilisation** est une approche basée sur l'utilisation des plantes capables d'absorber certains ETM volatils l'atmosphère via les stomates (Sabreena *et al.*, 2022). Elle a été utilisée pour éliminer des éléments métalliques tels que le Hg et le Se, grâce à des micro-organismes présents dans les plantes et jouant un rôle essentiel dans le processus de transformation (Bunditboondee *et al.*, 2023). Comme exemples, *Astragalus bisulcatus*, *Stanleya pinnata*, et *Astragalus racemosus* sont des espèces qui peuvent être utilisées pour le sélénium (Freeman *et al.*, 2011 ; Guarino *et al.*, 2020), *Arabidopsis thaliana* pour le mercure, et *S. maltophilia* et *Arundo donax* pour l'arsenic (Guarino *et al.*, 2020). En outre, le Hg, l'As et le Se peuvent se volatiliser dans l'atmosphère mais leurs formes volatiles sont toujours toxiques pour les êtres vivants.

La **phytostabilisation** permet d'incorporer les polluants organiques ou inorganiques dans les tissus racinaires des plantes, entraînant la réduction de leur biodisponibilité dans la rhizosphère (Sabreena *et al.*, 2022). Ce procédé fait appel à des espèces résistantes aux ETM capables de les immobiliser dans le sol et diminuer ainsi leur biodisponibilité, ce qui empêche leur migration dans l'écosystème et diminue la possibilité de leur pénétration dans la chaîne alimentaire. Hrkić *et al.* (2020) ont souligné le potentiel élevé de *Salix* à stabiliser le Cd dans ses racines (environ 6728 mg/kg). De même, *Pinus radiata*, espèce forestière capable d'accumuler le Cu dans ses racines (Quiroz *et al.*, 2024). Galal *et al.* (2017) ont montré également que *Vossia cuspidata* a la capacité d'accumuler des teneurs très élevées de Cr, Cu et Pb dans leurs racines au printemps (effet de climat). Cette approche peut être influencée par divers facteurs, notamment le pH, la

Chapitre I. Synthèse bibliographique

teneur en matière organique, la texture, le potentiel d'oxydoréduction du sol, et la température. Il existe donc de nombreux obstacles à la restauration des sols à l'aide de cette approche. Par conséquent, l'amendement du sol contaminé permet de surmonter ces limites et d'augmenter l'efficacité de la restauration.

L'amendement est un produit minéral ou organique appliqué au sol contaminé pour améliorer sa fertilité en modifiant ses propriétés physicochimiques. Le choix d'un amendement repose principalement sur les caractéristiques agronomiques du sol, sa facilité d'application, son efficacité et son coût.

Le biochar est l'un des amendements organiques utilisés pour assister la phytostabilisation. Plusieurs études ont montré son intérêt pour améliorer la stabilisation végétale des polluants dans les sols contaminés (Upadhyay *et al.*, 2024 ; Radziemska *et al.*, 2021 ; 2022 ; Diquattro *et al.*, 2024 ; Qiu *et al.*, 2024) (Figure I.10).

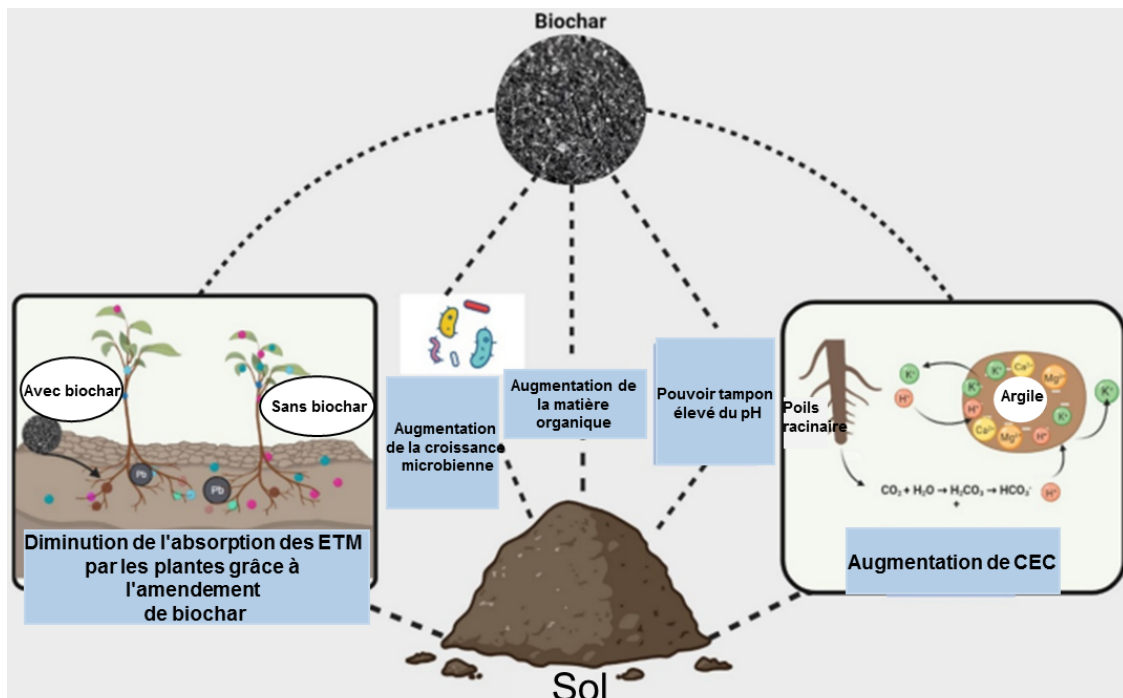


Figure I. 10. Effets du biochar sur le sol contaminé et sur la plante : ETM : éléments traces métalliques ; CEC : capacité d'échange cationique ; les points colorés correspondent aux ETM ; les cercles colorés autour de l'argile correspondent aux protons et aux nutriments et les flèches représentent l'échange cationique (adapté de Upadhyay *et al.*, 2024).

Il peut améliorer la croissance des plantes telles que la longueur des racines et des tiges (Qiu *et al.*, 2024), la biomasse végétale (Radziemska *et al.*, 2021 ; 2022 ; Diquattro *et al.*, 2024 ; Qiu *et al.*, 2024) et les caractéristiques du sol telles que le pH, la CEC, la CE (Haile *et al.*, 2024 ;

Abukari & Cobbinah, 2024), l'absorption des nutriments par les végétaux (Diquattro *et al.*, 2024 ; Ramírez-Zamora *et al.*, 2022), et il permet également de réduire la biodisponibilité des éléments traces métalliques (Ramírez-Zamora *et al.*, 2022, Rehman *et al.*, 2023). L'application de biochar contribue également à enrichir la diversité microbienne du sol contaminé (Lebrun *et al.*, 2021). En raison de sa structure poreuse et de sa capacité à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol, il offre des habitats favorables aux microorganismes et crée un environnement propice à leur développement. Toutefois, son efficacité varie en fonction de la nature du biochar utilisé et des conditions environnementales (Tableau I.4). En revanche, Chen *et al.* (2021) ont montré que le biochar peut avoir un impact négatif sur l'équilibre des communautés microbiennes du sol, en réduisant les populations fongiques tout en favorisant les bactéries, ce qui peut entraîner une réduction de la cohésion et de la durabilité du sol. Par ailleurs, Qiu *et al.* (2024) ont montré que le biochar peut aussi réduire la mobilité de certains métaux tels que le plomb, mais il peut involontairement augmenter la mobilité d'autres métaux, tels que l'arsenic, pouvant ainsi compliquer l'approche phytostabilisation

Bien que plusieurs études recommandent le biochar pour optimiser le procédé de phytostabilisation des préoccupations subsistent sur la présence des ETM dans le biochar lui-même, ses effets environnementaux à long terme et son efficacité.

2. 3. Dynamiques des éléments traces métalliques dans le système sol-plante

Le système sol-plante joue un rôle primordial pour comprendre la dynamique des éléments nutritifs, ainsi que des éléments toxiques dans l'écosystème. Les mécanismes de transmission de ces éléments du sol vers les plantes sont indispensables à connaître pour déterminer leur mobilité et leur biodisponibilité, lesquelles pourraient avoir un impact sur la production agricole, la santé de l'écosystème et par conséquent la santé humaine.

2.3.1. Mécanismes de transfert des ETM du sol vers le système racinaire

Comme signalé précédemment, il existe une forte interrelation entre la spéciation, la mobilité, la biodisponibilité, et la phytodisponibilité des ETM, lesquels sont influencés par un certain nombre de facteurs. Également, l'activité biologique au sein de la rhizosphère est capable de modifier les caractéristiques physico-chimiques du sol à proximité du système racinaire. Grâce à l'acquisition de connaissances approfondies du système racinaire et des mécanismes de tolérance des plantes, est fondamentale pour comprendre leur capacité à croître et à résister dans

les zones contaminées. Généralement, les plantes sont incapables d'accumuler la totalité des ETM présents dans un sol contaminé. Les ions métalliques doivent être libérés dans la solution du sol avant d'être absorbés par les racines. Pour y parvenir, les plantes utilisent une succession de processus contribuant au transfert de l'élément métallique de la phase solide du sol vers la solution du sol pour accroître sa biodisponibilité.

Ce processus implique notamment la sécrétion de phytosidérophores qui sont des composés organiques augmentant la biodisponibilité des ETM dans la rhizosphère (Reichman & Parker, 2005). Par ailleurs, la production de carboxylates améliore l'efficacité des plantes à extraire les ETM présents dans le sol, tandis que la libération des protons et des acides organiques favorise la solubilisation des ETM (Molnár et al., 2023). Ceci se réalise dans le but de faciliter deux processus interdépendants : la chélation des ETM par la formation de complexes organométalliques stables et leur solubilisation afin de favoriser leur absorption par les racines.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Tableau I.4. Récapitulatif de quelques études récentes sur la phytostabilisation assistée par le biochar

Espèce végétale	ETM	Dose (m/m)	Durée	Observations	Limites	Références
<i>Dactylis glomerata</i> L	Cu, Cd, Pb et Zn	3 %	52 jours	Augmentation du pH du sol ; Augmentation de la biomasse végétale ; Amélioration de la teneur de Cu, Cd, Pb et Zn dans la partie racinaire de la plante ; Réduction de la teneur totale en ETM dans le sol contaminé ;	Aucun effet significatif sur la teneur biodisponible de Cu et Zn ; La durée de l'étude est courte, ce qui peut varier les effets du biochar avec le temps ;	Radziemska <i>et al.</i> , 2021
<i>Lolium perenne</i> L.	Zn, Pb, Cu, Cr, As, et Hg	3 %	64 jours	Amélioration de la phytostabilisation ; Augmentation du pH du sol ; Amélioration de la biomasse végétale ; Transformation du Cu, Pb, Cr et Hg en forme leur stable ; Diminution de la mobilité des ETM ; Réduction de l'effet négatif des ETM sur la diversité bactérienne ;	L'efficacité du biochar varie en fonction du métal et des conditions du sol ;	Radziemska <i>et al.</i> , 2022
<i>Prosopis laevigata</i>	Cu, Pb, Cd, Fe et Mn	10 %	6 mois	Diminution de la bioaccumulation et de la translocation du Cu, du Pb et du Cd ; Augmentation de la translocation de métaux essentiels (le Fe et le Mn) ;	La durée limitée peut ne pas refléter pleinement les avantages et les inconvénients de l'application de biochar à long terme ;	Ramírez-Zamora <i>et al.</i> , 2022
<i>Fagopyrum esculentum</i> et <i>Sinapis alba</i>	Zn, Cu, Cr, Cd, Pb et Ni	–	–	Augmentation du pH du sol ; Réduction des formes des ETM disponibles ; Stabilisation des ETM : pour <i>Sarrasin</i> Ni > Cr > Pb > Cu > Zn et pour la <i>Moutarde blanche</i> : Ni > Pb > Zn > Cr > Cu ;	L'efficacité du biochar varie d'un métal à l'autre et d'une espèce végétale à l'autre ; L'effet du biochar dépend du mécanisme d'absorption et des caractéristiques d'accumulation des ETM ;	Barčauskaitė <i>et al.</i> , 2023

Chapitre I. Synthèse bibliographique

<i>Hibiscus cannabinus</i> L.	Cd et Pb	0 – 5 %	–	Réduction de stress oxydatif avec 3 % de biochar ; Augmentation du pH du sol et de la CE ; Immobilisation du Cd et du Pb dans le sol minier ;	L'efficacité du biochar dépend du taux d'application ;	Rehman <i>et al.</i> , 2023
<i>Lolium perenne</i> L	As et Pb	3 %	–	Stabilisation de Pb dans le sol ; Réduction de Pb et As dans la plante ; Amélioration de la biomasse végétale ;	Augmentation de la mobilité de l'As ;	Qiu <i>et al.</i> , 2024
<i>Cynara cardunculus</i> , <i>Brassica napus</i> et <i>Carthamus tinctorius</i>	Cd, Zn, et Pb	5 %	–	Amélioration de la biomasse végétale ; Augmentation de l'accumulation des ETM dans les racines ;	Réduction de la population bactérienne et des activités enzymatiques, ce qui entraîne des effets négatifs sur la santé du sol et la diversité bactérienne ;	Diquattro <i>et al.</i> , 2024
<i>Lolium perenne</i>	Cd, Cr et Pb	1 %	45 jours	Augmentation du pH du sol et de la CE ; Augmentation de 11,6 % de la rétention des ETM dans les organes des plantes ; Réduction de la biodisponibilité de Cd et Pb;	Augmentation de la biodisponibilité de Cr ;	Serrano <i>et al.</i> , 2024

La fraction mobile du métal en question est ainsi disponible pour transporter vers les tissus de la plante (Figure I.11).

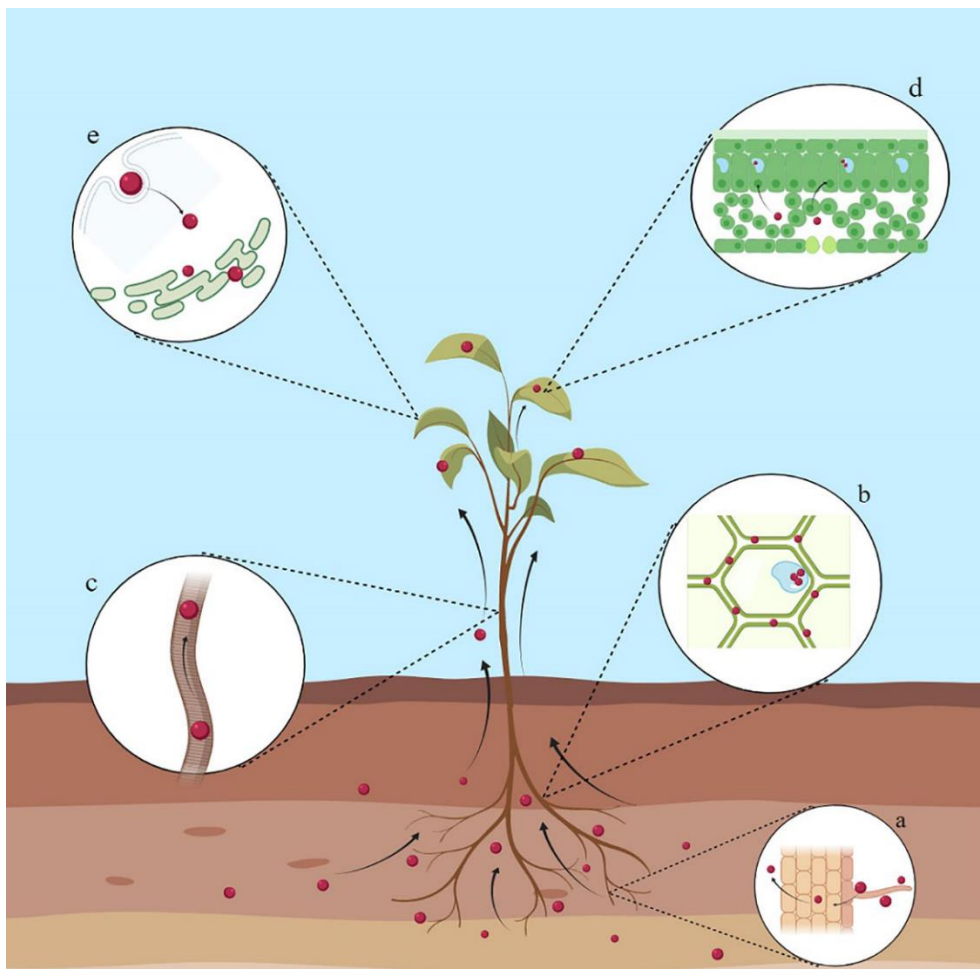


Figure I. 11. Transfert des ETM du sol vers la plante : (a) accumulation des ETM à la surface des racines ; (b) accumulation des ETM dans les parois cellulaires ; (c) translocation des ETM du système racinaire à la tige de la plante ; (d) accumulation des ETM dans les feuilles ; (e) accumulation des ETM dans l'endocytose ; les points rouges : les ETM ; et les flèches : direction des ETM (adapté de He *et al.* 2024).

La mobilisation des ions métalliques dans le sol est principalement liée au pH du sol, aux facteurs chélateurs tels que la taille des racines, la température, l'interaction entre les métaux, la concentration des éléments nutritifs et la salinité. Les ETM en solution du sol sont alors absorbés par le système racinaire via deux types d'absorption soit de manière active soit de manière passive selon la concentration des ETM présents.

L'absorption passive par le système racinaire se déroule quand les éléments métalliques arrivent dans la plante avec le flux de transpiration sans nécessiter de dépense énergétique (Figure I.12). C'est une absorption très lente (Jadhav *et al.*, 2023), assurée par des canaux d'eau

et des canaux ioniques. Les canaux anioniques représentent une voie importante d'absorption et de transport transmembranaires des ETM dans les racines de la plante et interviennent dans la régulation de l'osmose et le maintien de la stabilité des membranes en cas de stress métalliques (Roberts, 2006). Les canaux anioniques facilitent le passage d'acides organiques tels que le citrate, qui peut fixer les ETM, contribuant ainsi à leur détoxification et à leur transport. La circulation homéostatique des ions métalliques à travers ces canaux de diffusion le long d'un gradient de concentration transmembranaire ou d'un gradient de potentiel nécessite l'intervention de protéines de canaux ioniques (Jadhav *et al.*, 2023). Par exemple, Zhang *et al.* (2023c) ont montré que l'absorption du cadmium se fait par les canaux ioniques calciques. L'absorption passive joue un rôle particulièrement important pour les petits ions et les molécules qui peuvent librement diffuser à travers les membranes des cellules racinaires (Jadhav *et al.*, 2023).

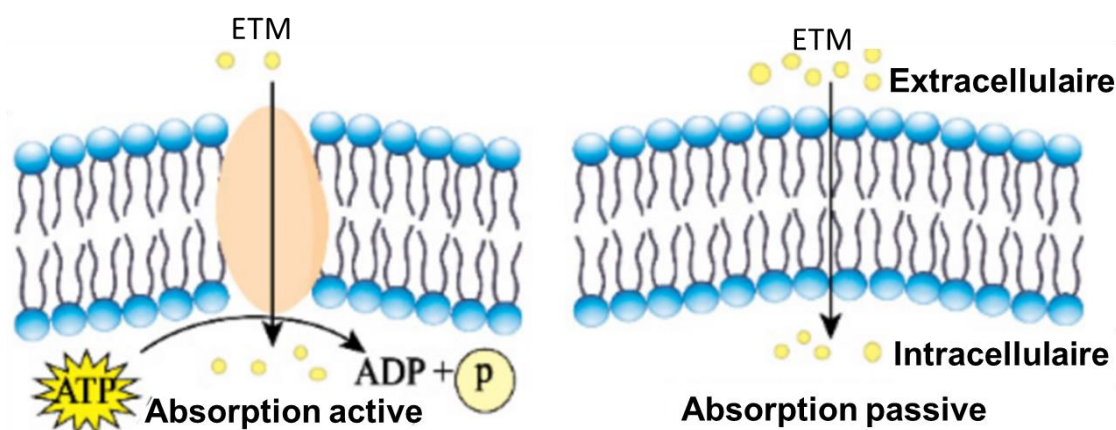


Figure I. 12. Mécanismes d'absorption racinaire : différence entre absorption active et passive (Adapté de Yang *et al.*, 2021b).

La circulation des ions dans les racines se fait par deux voies : *i*) voie apoplasmique où le déplacement des ions se réalise dans la paroi, de la concentration la plus forte vers la concentration la plus faible et *ii*) voie symplasmique où les ions entrent dans la cellule et leur déplacement se fait par les plasmodesmes (Figure I.13).

Au niveau de l'endoderme, une sélection des ions peut avoir lieu, cependant les molécules ne peuvent pas traverser la membrane plasmique (voie symplasmique) en raison des barrières apoplasmiques assurées par la présence de cire dans la bande de Caspary, qui bloque leur passage (Robbins *et al.*, 2014). Ainsi, les voies de déplacements peuvent être suivies à nouveau jusqu'à ce qu'elles soient chargées dans le xylème.

Absorption active est facilitée par des transporteurs à pompe ionique et des transporteurs ABC (pour ATP-Binding Cassette) qui favorisent un passage sélectif des ions. Les protéines porteuses de pompes ioniques sont capables de transporter l'élément à travers la barrière cellulaire en s'opposant au gradient électrochimique et d'utiliser l'énergie de la synthèse de l'ATP pour contribuer au processus de transport actif des substances, en particulier la pompe à protons H^+ -ATPase et la pompe à ions calciques Ca^{2+} -ATPase. Les protéines ABC permettent de transporter des ions métalliques vers des vésicules sous forme de complexes de peptides chélatés, ce qui permet de réduire la toxicité pour la cellule végétale et de renforcer la capacité de résistance de la plante au stress abiotique (Jadhav *et al.*, 2023).

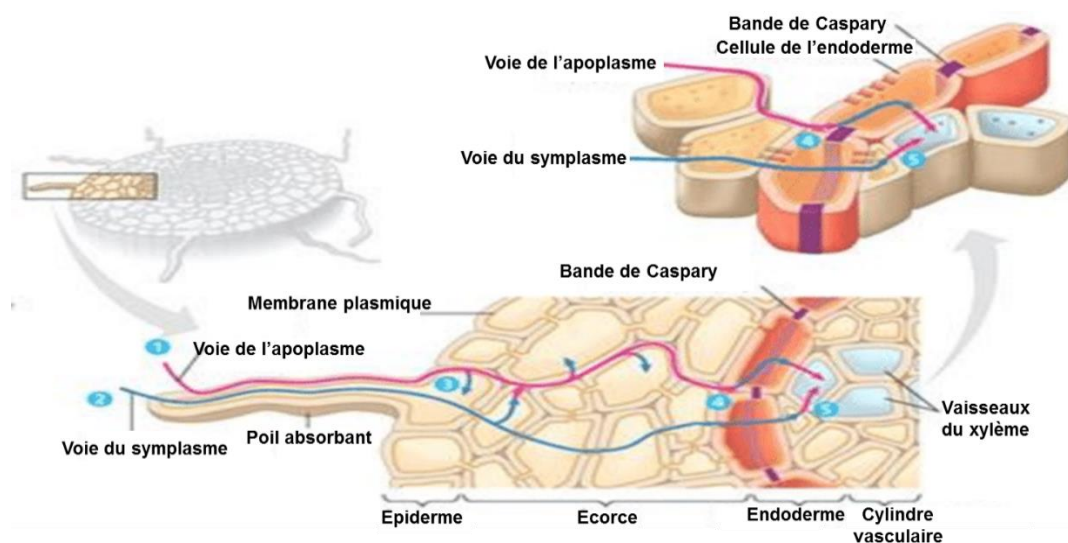


Figure I. 13. Voies de transfert apoplasmique et symplasmique au niveau de la racine : la numérotation indique les différentes étapes de ce transfert ; la coloration rose et la coloration bleue correspondent à la circulation des ions dans les racines par les deux voies ; la flèche grise : agrandissement de la zone (Hamdani, 2020)

Rôles des exsudats racinaires dans la solubilisation et la chélation des ETM

Les exsudats racinaires ont un rôle primordial dans la solubilisation et la chélation des ETM dans les sols pollués, améliorant de façon considérable l'approche de phytoremédiation. En effet, les espèces végétales peuvent produire divers types d'exsudats, libérés au niveau de la rhizosphère, modifiant ainsi les conditions chimiques du sol rhizosphérique, capable d'affecter la biodisponibilité des ETM et l'activité microbienne. Ces exsudats sont capables de former des complexes stables avec les ETM (Gao *et al.*, 2004) notamment des complexes organométalliques ou des chélates dans la rhizosphère. Également, ces exsudats peuvent changer les conditions d'oxydoréduction et le pH du sol, affectant considérablement la sorption

et la désorption des ETM sur les composants du sol, et encore dans l'espace apoplasmique, bloquant ainsi leur pénétration dans le symplasme (Violante *et al.*, 2008). La plupart des composants de l'exsudat rhizosphérique sont donc associés à des réactions d'oxydoréduction. Les composés organiques libérés dans le sol contaminé peuvent solubiliser fortement les ETM et augmenter leur biodisponibilité pour faciliter l'absorption par les plantes (Ma *et al.*, 2022). De plus, ils peuvent améliorer la croissance de la plante en augmentant la disponibilité des éléments nutritifs et en réduisant la nocivité des ETM présents dans le sol. Cependant, leur efficacité varie en fonction des espèces végétales, des conditions environnementales ainsi que des populations microbiennes qui se trouvent dans la rhizosphère (Ma *et al.*, 2022).

2.3.2. Translocation des ETM des racines vers les parties aériennes

Après l'absorption racinaire des ETM, une portion de ces éléments peut ensuite être transportée par le xylème vers les parties aériennes (translocation), processus qui nécessitent parfois des agents de complexation comme les acides aminés et les acides organiques. Chez certaines espèces, les ETM tels que Fe, Co, Cr sont retenus dans les racines et seulement une faible proportion arrive jusqu'aux parties aériennes (Page & Feller, 2015 ; Shahid *et al.*, 2017). Les ions toxiques sont généralement détoxifiés par des chélateurs tels que les phytochélatines, qui forment ainsi des complexes stables et piègent les métaux dans les vacuoles (Parida *et al.*, 2024). Cependant, la capacité de translocation des ETM à varier considérablement selon l'espèce considérée. Signalons toutefois, que l'accumulation de ETM au niveau des feuilles, des tiges et des fruits, demeure ambiguë, si cela est dû à un transport actif ou à un défaut d'immobilisation au niveau des racines. Ces plantes ont recours à certaines protéines de transport spécifiques telles que les protéines des familles ALMT, ZIP et MATE ou les métallothionéines et le glutathion afin de faciliter le transport et l'entrée des ETM au niveau des racines (Küpper *et al.*, 2024), puis vers les parties aériennes. En outre, la transpiration favorise le transport des ETM tels que Mn, Zn et Ni au sein du xylème vers les organes aériens (Page & Feller, 2015). Par ailleurs, le phloème assure à la fois la circulation des ETM des organes les plus âgés vers les organes les plus jeunes des parties aériennes de la plante et la redistribution des nutriments essentiels (Page & Feller, 2015). Toutefois, certains éléments tels que le Ni et le Zn sont extrêmement libres dans le phloème, permettant leur redistribution vers les tissus en croissance et même vers les fruits (Page & Feller, 2015). Ainsi, la capacité des plantes à transférer le métal en question vers leur partie aérienne peut être confirmée par la

valeur du facteur de translocation (TF). Si ce facteur est élevé ($TF > 1$) cela indique qu'il existe un mouvement efficace entre le système racinaire et les parties aériennes de la plante. Cependant, ce facteur varie en fonction de l'espèce elle-même, de l'élément en question, de l'environnement, et de la composition du sol.

Certaines espèces peuvent absorber, accumuler et tolérer des concentrations élevées des ETM par rapport à celles du milieu. Ces espèces ont alors été classées comme plantes hyperaccumulatrices, qui sont particulièrement importantes pour l'approche de phytoremédiation en raison de leur efficacité à dépolluer les sols contaminés. Par exemple, *Helianthus annuus* peut accumuler le Pb et présenter une translocation notable pour le Cu et le Cd (Saa-Aondo *et al.*, 2024 ; Widyasari *et al.*, 2024), *Cynodon dactylon* est efficace pour le Zn et le Cd (Saa-Aondo *et al.*, 2024), *Hanjuang* (*Cordyline fruticosa*) montre une accumulation élevée du Pb et du Cu (Widyasari *et al.*, 2024), la *Brassica* et l'*Arabidopsis* sont également reconnues pour leurs fortes capacités d'accumulation des ETM (Nikolić et Tomašević, 2020). Pollard *et al.* (2009) ont montré que *Phytolacca americana* capable d'accumuler des concentrations de Mn dépassant 32 000 µg/g. Li *et al.* (2018) ont trouvé que la fougère (*Pteris vittata*) est une espèce hyperaccumulatrice de l'As. En outre, Yang *et al.* (2021a) ont démontré le potentiel élevé de *Salix* à accumuler le Cd, le Zn et Cu dans sa partie aérienne.

2.3.3. Tolérance des plantes vis-à-vis des ETM

Pour de fortes concentrations en ETM, les mécanismes de prévention ne sont plus adaptés et les teneurs en ions métalliques dans le cytoplasme augmentent. Cela entraîne la formation de certains radicaux libres qui provoquent un stress oxydatif (Fryzova *et al.*, 2018). Les plantes sont alors contraintes ; elles subissent en conséquence des modifications biochimiques afin de se protéger contre le stress oxydatif. Le niveau des dégâts cellulaires provoqués par les métaux et les métalloïdes dépend du taux de production de radicaux libres, des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et également de la capacité des mécanismes de détoxification et de réparation. Les plantes sont donc obligées de déployer une stratégie de traitement abrupte et efficace pour limiter les dommages cellulaires causés par les ERO. Elles peuvent ensuite déclencher une série de mécanismes antioxydants de défense (enzymatiques et non enzymatiques) lors de la formation de ERO (Ningombam *et al.*, 2024). La superoxyde dismutase (SOD) agit en 1^{er} lieu quand le système antioxydant enzymatique au sein d'une cellule est mis en œuvre (Ighodaro & Akinloye, 2018 ; Rajput *et al.*, 2021). Cette enzyme catalyse la dismutase de l'anion superoxyde

sous forme de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'oxygène O_2 . Les isoformes de la SOD, dépendantes de cofacteurs métalliques, sont localisées dans divers compartiments cellulaires (Ighodaro & Akinloye, 2018). Il intervient également la catalase (CAT) qui est une enzyme antioxydante essentielle, transformant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O et en oxygène (O_2) (Ningombam *et al.*, 2024). Le rapport d'équilibre SOD/CAT est primordial pour conserver un niveau stable et constant d' O_2^- et d' H_2O_2 . La peroxyde dismutase (POD) est une hémoprotéine capable d'agir comme catalyseur pour l'oxydation de différents produits organiques et inorganiques à l'aide d' H_2O (Gazaryan & Egorov, 1996). Le glutathion réductase (GR) fait entièrement partie du cycle absorbate_ glutathion. Elle catalyse la diminution du glutathion, qui est un antioxydant non enzymatique mais essentiel, renforçant ainsi la capacité de la plante à détoxifier les ETM. La glutathion peroxydase (GPX) transforme H_2O_2 en H_2O en se basant sur le glutathion (GSH) comme agent réducteur. Elle entraîne également l'oxydation des hydroperoxydes lipidiques en d'autres hydroperoxydes. Les activités enzymatiques antioxydantes jouent un rôle crucial dans la détection du degré de tolérance et de sensibilité de diverses espèces de plantes au stress métallique (Ningombam *et al.*, 2024). Par exemple, l'exposition de *Phaseolus vulgaris* de la famille *Fabaceae* au cadmium a entraîné une augmentation de la production des enzymes telles que la catalase et l'absorbate peroxydase, ce qui révèle une activité photosynthétique plus importante et une réponse au stress oxydatif (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2020). En revanche, Hachani *et al.* (2022) ont montré que *Pinus halepensis* réagit au stress induit par la présence du Pb, du Zn et du Cd par une augmentation de la concentration en proline, accompagnée d'une diminution des activités antioxydantes. Khudhur & Albarzinji (2022) ont montré que chez les deux espèces *Leucaena leucocephala* et *Gleditsia triacanthos* exposées au Ni et au Pb, l'activité de la peroxydase était augmentée tandis que l'activité de la réductase était variable, ce qui souligne que les systèmes de défense diffèrent d'une espèce à l'autre.

Même si les mécanismes de défense sont indispensables pour assurer la résistance des plantes au stress dû aux ETM, il est également important de prendre en compte que les concentrations métalliques excessives pourraient dépasser les capacités de ces mécanismes, entraînant une phytotoxicité, une détérioration de la santé des plantes voire leur mort.

2.3.4. Capacité de tolérance des plantes actinorhiziennes face aux ETM

Les espèces actinorhiziennes représentent les plantes de dicotylédones ligneuses non légumineuses qui forment des symbioses avec des actinobactéries du genre *Frankia*, fixatrices de l'azote (Bhattacharyya *et al.*, 2024). Le terme actinorhizienne fait référence non seulement à la bactérie filamenteuse *Frankia*, mais aussi à la localisation racinaire des nodules fixateurs d'azote. Ces plantes actinorhiziennes sont principalement des espèces ligneuses classées en 4 quatre sous-classes, huit familles telles que les *Betulaceae*, les *Myricaceae*, les *Casuarinaceae* et 25 genres regroupant plus de 220 espèces (Dawson & Klemp, 1987 ; Pashke, 1997). Leur capacité à fixer l'azote et à améliorer la fertilité des sols les rend indispensables pour assurer la restauration des sites contaminés. Les espèces actinorhiziennes sont souvent réparties en Australie, en Amérique du nord, en Asie et en Europe, alors que l'Afrique est particulièrement dépourvue de ces plantes indigènes, à l'exception peut-être de *Myrica*, qui pourrait être due au type de sols et à des conditions climatiques historiques qui sont moins favorables à la création de symbioses actinorhiziennes (He *et al.*, 2004).

Ces plantes jouent un rôle crucial dans les secteurs économique et écologique, en particulier dans les régions qui font face à des défis environnementaux. Plusieurs espèces actinorhiziennes sont exploitées pour la production de bois, de combustible et à des fins médicinales, en particulier en Afrique (Ribeiro-Barros *et al.*, 2019). En outre, les arbres actinorhiziens ont acquis une importance environnementale indéniable en raison de leur grande adaptabilité à des conditions environnementales différentes de celles de leur milieu d'origine, de leur résistance aux principales phytopathologies, et de leur tolérance à une vaste série de contaminants toxiques (Furnholm & Tisa, 2014 ; Diagne *et al.*, 2015 ; Ghazouani *et al.*, 2020). Elles constituent donc de précieuses plantes à multiples usages. Callender *et al.* (2016) ont démontré que les plantes actinorhiziennes telles que *A. glutinosa* et *A. crispa* peuvent réduire les ETM extractibles dans les sols contaminés par un facteur pouvant aller jusqu'à deux, et augmentent le pH, améliorant ainsi la santé des sols sans hyperaccumulation de toxines. Diagne *et al.* (2013) ont montré que la présence de *Frankia* améliore la teneur en azote et la biomasse totale des plantes actinorhiziennes dans les environnements contaminés, améliorant ainsi leur tolérance et leur croissance. En outre, les *Frankia* sont reconnues par leur résistance aux ETM (Furnholm & Tisa, 2014 ; Ghazouani *et al.*, 2020). Ces plantes permettent également d'améliorer l'abondance

des microbes qui participent aux cycles biogéochimiques des nutriments et la dégradation des polluants dans le sol (Callender *et al.*, 2016 ; Gregory, 2022).

2.3.5. Potentiel de *Casuarina glauca* dans les stratégies de phytoremédiation

Parmi les espèces actinorhiziennes dans les régions arides et semi-arides, les plus abondantes font partie de la famille des *Casuarinaceae* tels que *Casuarina glauca*, caractérisée par ses feuilles en forme d'aiguilles et ses structures de reproduction particulières (Dörken *et al.*, 2018). Elle est largement utilisée en dehors de son aire géographique et parmi les espèces prometteuses elle est celle qui se développe avec succès sur les sols dégradés (Bejaoui *et al.*, 2008 ; Diagne *et al.*, 2015). Le terme *Casuarina* a été défini par le botaniste allemand Georg Eberhard Rumphius en 1650 (National Research Council, 1984). Il provient du mot malais (kasuari), qui rappelle la similitude entre les branches filamenteuses et tombantes et le plumage de l'oiseau Casoar (*Casuarus casuarus*). Le genre *Casuarina* comprend approximativement 18 espèces (He & Critchley, 2008). La famille des *Casuarinaceae* regroupe environ 90 espèces d'arbres et d'arbustes originaires d'Australie, de diverses régions du littoral pacifique et d'Asie du Sud-Est (Wilson, 1997). Ces plantes sont capables de former des nodules fixateurs de l'azote en symbiose avec l'actinomycète tellurique *Frankia* (Wall, 2000).

Dans le contexte de la phytoremédiation, plusieurs études menées ont démontré que *Casuarina glauca* représente une piste intéressante pour la restauration de l'environnement (Ghazouani *et al.*, 2020 ; Slaimi *et al.*, 2022). En effet, cette espèce reconnue pour sa capacité d'adaptation et sa résistance à des environnements contaminés, peut efficacement absorber et stabiliser les polluants. Zouari *et al.* (2023) ont montré que *C. glauca* est l'une des rares plantes ayant la capacité d'accumuler des éléments tels que Cu, Zn, Mn, Cd, Ni, Co et Pb, particulièrement Cu et Zn, principalement dans les racines. Cette répartition indique un système de rétention racinaire efficace, ce qui limite le passage des ETM vers la partie aérienne de la plante, soulignant ainsi le caractère potentiel de *C. glauca* dans l'approche de phytostabilisation. Slaimi *et al.* (2022) ont par ailleurs démontré que cette espèce a la capacité de stabiliser les ETM, notamment le Cu, le Cd et le Pb présents dans le sol irrigué avec des eaux usées urbaines provenant d'une station d'épuration, tout en assurant une bonne croissance, un bon échange gazeux et une meilleure synthèse de la chlorophylle totale et des métabolites primaires et secondaires. Bousbih *et al.* (2023) ont montré que *Casuarina glauca* est une espèce efficace pour remédier les eaux usées industrielles fortement polluées par différents ETM. Slaimi *et al.*

(2021) ont également révélé que *C. glauca* est une espèce végétale appropriée pour la phytoextraction des métaux Cd, Pb, Zn et Ni, car elle peut absorber et accumuler des ETM dans ses racines et ses pousses avec un facteur de bioconcentration élevé (> 1). Zouari *et al.* (2019) ont démontré que Cu, Co, Zn, Cd et Pb s'accumulent principalement dans les racines de *C. glauca*, avec des concentrations particulièrement élevées pour le Co et le Pb, tandis que le Mn se trouve en plus grande quantité dans les feuilles. Elle est également tolérante à la fois aux stress salins et métalliques (Zouari *et al.*, 2019). Les résultats de ces études sont encourageants en ce qui concerne le potentiel et la tolérance de *C. glauca* à une large gamme d'ETM. Cependant, il est intéressant de constater que son efficacité repose sur un certain nombre de facteurs, dont le métal, la composition du sol et la durée de l'expérience. La majorité des recherches menées sur l'utilisation des espèces actinorhiziennes s'appuient sur l'utilisation des amendements pour améliorer la fertilité du sol contaminé afin de favoriser une croissance optimale des plantes, tout en intégrant des approches de phytoremédiation pour réussir la restauration des sites contaminés (Riely *et al.*, 2021).

3. Études microbiologiques des sols : rôles des microorganismes dans la remédiation des sols contaminés

Les micro-organismes du sol participent à la plupart des réactions biochimiques du sol, ce qui contribue largement à la préservation de la fertilité, via la dégradation de la matière organique et la libération des nutriments, ainsi que la durabilité des cycles biogéochimiques. L'évaluation de la diversité microbiologique des sols peut donc fournir des informations pertinentes sur la qualité du sol et présente un grand potentiel pour prédire la restauration des sites contaminés.

3.1. Microbiologie des sols miniers et impacts des ETM

En général, la présence des ETM entraîne une réduction de la diversité et l'abondance microbienne dans le sol. Les micro-organismes sensibles à la toxicité de ces polluants peuvent diminuer ou disparaître après une exposition à des concentrations élevées, tandis que ceux qui peuvent les tolérer développent une certaine adaptation à des concentrations accrues de métaux et de métalloïdes (Feketeová *et al.*, 2021) et deviennent dominants.

- Communautés microbiennes et adaptation aux ETM

Les communautés microbiennes du sol peuvent s'adapter à la contamination par les ETM résultant de l'activité minière. Elles résistent et même se développent dans des environnements fortement contaminés par les ETM, ce qui indique une interaction biotique-abiotique entre la diversité microbienne et la composition chimique du sol minier. Cela a eu pour conséquence l'évolution de divers mécanismes de résistance aux ETM. Ces mécanismes se divisent en deux grands groupes :

Mécanismes extracellulaires : (1) les micro-organismes sont capables d'adsorber les ETM présents dans leurs parois cellulaires, limitant ainsi la biodisponibilité et la toxicité de ces contaminants (Kothe *et al.*, 2010). (2) En outre, certaines bactéries peuvent sécréter des sidérophores, des chélateurs de fer synthétisés capables de fixer les polluants, facilitant ainsi leur séquestration et atténuant leurs effets nocifs. Les *Microbacterium*, par exemple, peuvent produire des sidérophores qui renforcent la fixation d'ions métalliques tels que le nickel, ce qui offre un potentiel d'applications pour les biosorbants (Virpiranta *et al.*, 2020). Cependant, Wang *et al.* (2022a) ont démontré que *Burkholderia*, isolée des sols miniers à Shangyu, Zhejiang, Chine, produit des sidérophores de type catécholates qui peuvent solubiliser le Pb, le Zn et le Cd. Les sidérophores ont donc un double rôle : *i*) une affinité privilégiée pour certains éléments et ces derniers sont ainsi immobilisés dans des complexes stables, ce qui réduit leur toxicité pour l'écosystème et *ii*) la capacité à mobiliser des ETM déjà adsorbés sur des particules de sol telles que les argiles et les oxydes de fer et de manganèse en les désorbant par compétition ionique (Sharma *et al.*, 2023a ; Kang & Peña, 2023). (3) La communauté microbienne du sol peut également transformer les ions métalliques sous formes stables ou moins solubles, ce qui permet de les immobiliser (Kothe *et al.*, 2010). Elle peut convertir ces ions en précipités de type oxydes, sulfides ou encore phosphates (Ortiz-Castillo *et al.*, 2021 ; Wang *et al.*, 2022b). Et comme stratégie de défense, la communauté peut produire également des exopolysaccharides (Zhang *et al.*, 2024) ou des acides organiques pour complexifier les ETM (Chaudhary & Sindhu, 2024) et les rendre moins mobiles.

Mécanismes intracellulaires : (1) Les micro-organismes peuvent piéger les ETM dans certaines structures cellulaires (séquestration intracellulaire). Les souches de streptomycètes, par exemple, peuvent résister à des concentrations élevées de nickel en le stockant au niveau intracellulaire réduisant ainsi sa biodisponibilité et sa toxicité (Kothe *et al.*, 2010). (2) Les micro-organismes peuvent modifier l'état d'oxydation des métaux et les transformer en formes

moins toxiques (biotransformation). Ce processus est indispensable pour des métaux tels que le cadmium et le mercure, qui sont très toxiques sous leur forme élémentaire (Bore *et al.*, 2024). (3) Certaines communautés microbiennes sont caractérisées par des gènes spécifiques qui confèrent la résistance aux métaux et aux métalloïdes. Navas *et al.* (2021) ont montré que dans les sols contaminés, les gènes associés au métabolisme du cuivre et de l'arsenic sont abondants, ce qui indique une forte réaction d'adaptation. (4) Au niveau intracellulaire, les métaux se lient aux sidérophores, qui sont ensuite sécrétés, facilitant ainsi leur transport et limitant leur toxicité. (5) En outre, le métabolisme microbien tient un rôle critique dans le cycle des éléments essentiels, lequel peut être altéré par la présence des ETM. Cependant, les microorganismes réussissent à s'adapter en réaffectant réattribuant leur énergie pour maintenir leur intégrité cellulaire et détoxifier ces polluants (Newsome & Falagán, 2021).

Bien que certains microorganismes s'adaptent aux ETM en renforçant leurs interactions et en modifiant leurs fonctions, ce qui suggère des mécanismes de résilience dans les sols pollués, les contaminants peuvent avoir également des impacts sévères sur les communautés microbiennes.

- Effets des métaux sur les microorganismes du sol

L'activité minière conduit à des changements inévitables dans le microenvironnement des sols environnants. Plusieurs études ont montré que les éléments traces métalliques ont des conséquences négatives sur les activités et la diversité des communautés microbiennes. Ainsi, ils entraînent des changements de leur composition (Zhao *et al.*, 2020 ; Li *et al.*, 2023b). Zhen *et al.* (2019) ont démontré que la concentration biodisponible des ETM, en particulier Cu, Zn, Pb et Cd, est plus déterminante que leur concentration totale pour la composition et la fonctionnalité des communautés microbiennes dans les sols. L'exposition chronique aux ETM peut provoquer des altérations des paramètres écologiques, physiologiques et biochimiques des microorganismes. Ces altérations se traduisent particulièrement par une diminution de : i) la biomasse microbienne et de la respiration cellulaire ; ii) de la production de l'ADN et l'ARN, en affectant la réplication et la synthèse des protéines et iii) une augmentation du taux d'entropie métabolique, ce qui reflète l'inefficacité des processus métaboliques entraînant une perturbation énergétique au sein des cellules (Enya *et al.*, 2020 ; Lv *et al.*, 2024). Les micro-organismes répondent aux stress oxydatifs liés aux ETM en renforçant l'activité des enzymes de défense tels que la superoxyde dismutase et la catalase, qui limitent les dommages provoqués par les

ERO (Borisov *et al.*, 2021). Les taxons essentiels à la stabilité de l'écosystème peuvent également décliner, ce qui pourrait réduire la tolérance de la communauté à d'autres types de stress tels que la sécheresse et la salinité (Liu *et al.*, 2023). Les enzymes du sol représentent des indicateurs importants de la qualité et de la fonctionnalité du sol (Cui *et al.*, 2021). Elles sont le reflet de la fertilité du sol et des processus de transformation des nutriments. Elles sont sensibles aux métaux et aux métalloïdes et sont fréquemment utilisées pour évaluer la toxicité éventuelle des contaminants pour les microorganismes (Lee *et al.*, 2020). Qin *et al.* (2023) ont montré que la réduction des activités de la déshydrogénase et de l'uréase dans les sols miniers entraîne une réduction des taux de nitrification et d'ammonification. En outre, les caractéristiques du sol telles que le pH, le taux de matière organique et les teneurs en oligoéléments jouent un rôle primordial dans la régulation des activités microbiennes et la structure des communautés, en interagissant avec les effets des ETM (Bai *et al.*, 2021). Par ailleurs, Zhao *et al.* (2019) ont montré que les propriétés physicochimiques des sols, notamment la teneur en potassium, le taux de carbone organique, le pH, et les teneurs en ETM, influencent la distribution des communautés microbiennes en fonction des cinq types d'habitats du sol dans un site minier : (1) la zone d'exploitation minière active, (2) la zone de traitement, (3) la zone d'exploitation en tas, (4) la zone de résidus et (5) le champ des cultures maraîchères situées à proximité.

La contamination des sols par les ETM peut modifier l'abondance et la structure des communautés microbiennes, ainsi que leur diversité et leur homogénéité dans les sols contaminés. Les micro-organismes sensibles ont en particulier fortement diminué en abondance, tandis que les organismes tolérants ont augmenté en s'adaptant au stress, ce qui a modifié la structure de la communauté en conséquence.

3.2. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale

La rhizosphère est l'interface racine-sol, volume de sol où se concentre une forte densité microbienne et une activité microbiologique intense, (Figure I.14). Certains microorganismes de la rhizosphère, en particulier les rhizobactéries promotrices de la croissance, contribuent à la résistance du microbiote vis-à-vis des ETM et à la croissance des plantes dans les sols contaminés.

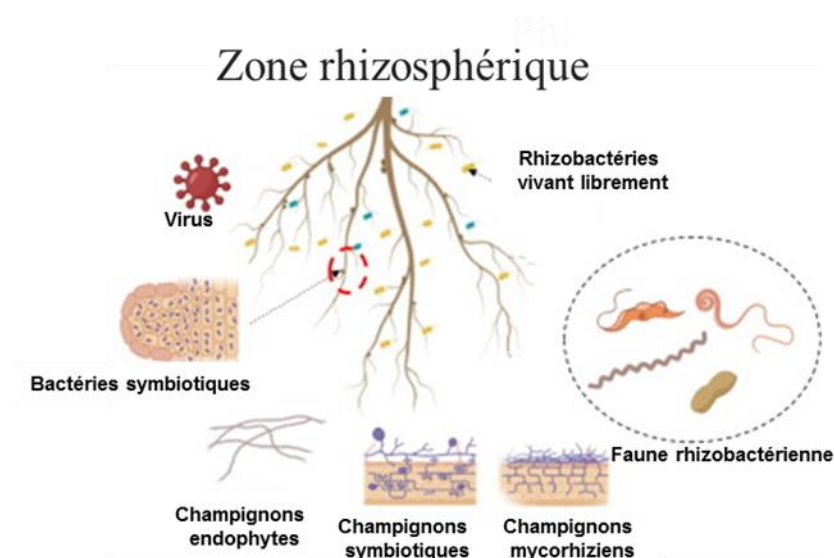


Figure I. 14. Communautés microbiennes de la zone rhizosphérique (adaptée de Chamkhi *et al.*, 2022).

3.2.1. Effets des PGPR sur les plantes

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes ou bactéries PGPR (« Plant Growth Promoting Rhizobacteria ») sont définies comme étant des bactéries situées dans la rhizosphère et ayant des effets bénéfiques sur le développement et la croissance des plantes. Ils se caractérisent par leur capacité à coloniser les racines, à survivre, à se reproduire et à concurrencer d'autres microorganismes, tout en favorisant la croissance des plantes (Kloepper *et al.*, 1980). Elles favorisent le développement des plantes par divers effets, directs ou indirects.

❖ Effets directs

Les PGPR favorisent la production d'hormones de croissance végétale (phytohormones), telles que les auxines et les gibbérellines, utilisées par les plantes afin de renforcer la croissance, la division cellulaire et le prolongement racinaire (Chamkhi *et al.*, 2021 ; Khoso *et al.*, 2024). Les bactéries des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Burkholderia* sécrètent divers types de phytohormones (Egamberdieva *et al.*, 2017). Certaines souches de PGPR telles que *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* et *Enterobacter* produisent l'enzyme ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate)

désaminase qui permet de réduire les niveaux d'éthylène, hormone végétale liée aux réponses au stress et de limiter son effet inhibiteur de la croissance des plantes (Jha *et al.*, 2021). Les PGPR augmentent également la disponibilité et l'absorption des éléments nutritifs du sol, en fixant l'azote et en solubilisant les nutriments présents dans le sol, afin de les rendre accessibles par les plantes tels que le zinc, le phosphore et le potassium (Ahmed *et al.*, 2019). La chélation de fer de faible poids moléculaire grâce à la production de sidérophores par certaines souches PGPR, telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Azotobacter* et *Serratia*. Les sidérophores servent à solubiliser le Fe des minéraux et/ou des matières organiques composées. Ce métal est un élément essentiel pour la croissance de la plante et peut également interagir avec certains ETM en les complexant ou en les précipitant, ce qui permet ainsi d'atténuer le stress à l'égard de la plante hôte (Gupta & Pandey, 2023).

❖ Effets indirects

Les PGPR stimulent indirectement la croissance des végétaux en luttant contre les phytopathogènes par la production de métabolites antimicrobiens et la production d'enzymes. Par conséquent, les plantes bénéficient de la destruction des bactéries et des champignons responsables des maladies, et la création d'une résistance systémique (Gupta & Pandey, 2023). Les PGPR génèrent des composés bioactifs de faible poids moléculaire ayant une activité antimicrobienne, même à faible concentration (Rizvi *et al.*, 2022). Ces composés font des PGPR les agents de régulation biologique les plus performants. Les PGPR produisent des composés non volatils tels que les phénazines, les phloroglucinols, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et les lipopeptides cycliques pour éliminer les agents pathogènes des plantes. L'utilisation de PGPR appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* a été signalée pour la gestion de certaines maladies chez de nombreuses plantes (Ngalimet *et al.*, 2021). Les PGPR produisent également des métabolites secondaires volatils issus d'acides gras, d'aromatiques, de composés azotés et soufrés *via* diverses voies de fermentation. Des bactéries des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas* et *Paenibacillus polymyxa* sont capables de produire de telles substances volatiles telles que les aliphatiques (disulfure de diméthyle), les aromatiques (indole), les cétones, alcanes ou alcènes (1-undécène) et terpènes (Chandra *et al.*, 2021). Ces substances participent à la transmission microbienne et à la communication entre les plantes et les micro-organismes (Sharifi & Ryu, 2018). Ces bactéries permettent d'activer la circulation des hormones végétales telles que les auxines et les gibbérellines, de stimuler la

croissance de la plante, la germination des graines, d'améliorer la formation des fruits et de réduire le stress biotique et abiotique (Sharifi *et al.*, 2018).

En outre, les PGPR sécrètent des enzymes hydrolytiques telles que la chitinase, la protéinase, et la glucanase, qui inhibent le développement des agents pathogènes des plantes (Vandana *et al.*, 2021), en détruisant l'intégrité structurelle de leur paroi cellulaire. Ces enzymes peuvent dégrader les composants de la paroi cellulaire des champignons et des organismes oomycètes, détruire les oospores, et affecter la germination des spores et l'élongation des tubes germinatifs des champignons phytopathogènes (Vandana *et al.*, 2021). Par exemple, les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* produisent des enzymes hydrolytiques telles que les protéases, qui peuvent inhiber la croissance et le développement des champignons filamenteux *in vitro* et *in vivo* (Dai *et al.*, 2024 ; Debez *et al.*, 2024).

La colonisation racinaire des PGPR peut entraîner une réaction de résistance systémique chez les plantes, qui serait efficace pour lutter contre un large spectre de phytopathogènes (comme les bactéries pathogènes, les champignons et les virus), tout en stimulant la croissance de la plante (Yadav & Meena, 2021). En réponse à la variété de stress environnementaux imposés aux plantes, tels que la biodisponibilité accrue des métaux et des métalloïdes, les PGPR permettent d'améliorer également la tolérance en régulant l'équilibre osmotique, l'homéostasie ionique, la transmission des phytohormones et en renforçant l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la peroxydase (Shahid *et al.*, 2022 ; Kushwaha *et al.*, 2024).

En conclusion, les effets bénéfiques (directs et indirects) des PGPR sur les plantes favorisent leur croissance, leur productivité et le maintien du bon fonctionnement de la plante en condition de stress.

3.2.2. Modes d'action des PGPR

Les effets des PGPR sur les plantes sont le résultat des différents mécanismes qu'ils développent, dont les modes d'action sont directs ou indirects. Les modes d'action indirects sont généralement ceux qui se produisent à l'extérieur de la plante, alors que les modes d'action directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et qui affectent directement son métabolisme. Ces mécanismes peuvent intervenir simultanément ou séquentiellement à différentes phases de la croissance de la plante (Figure I.15) :

Somers *et al.* (2004) ont classé les mécanismes d'actions des PGPR en quatre groupes sur la base de leurs effets : (1) biofertilisants : les PGPR permettent d'améliorer la disponibilité des nutriments pour les plantes ; (2) phytostimulateurs : elles augmentent la croissance des plantes, généralement par la production de phytohormones ; (3) rhizoremédiateurs : les PGPR permettent de dégrader les polluants organiques et finalement (4) biopesticides : elles permettent de lutter contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques.

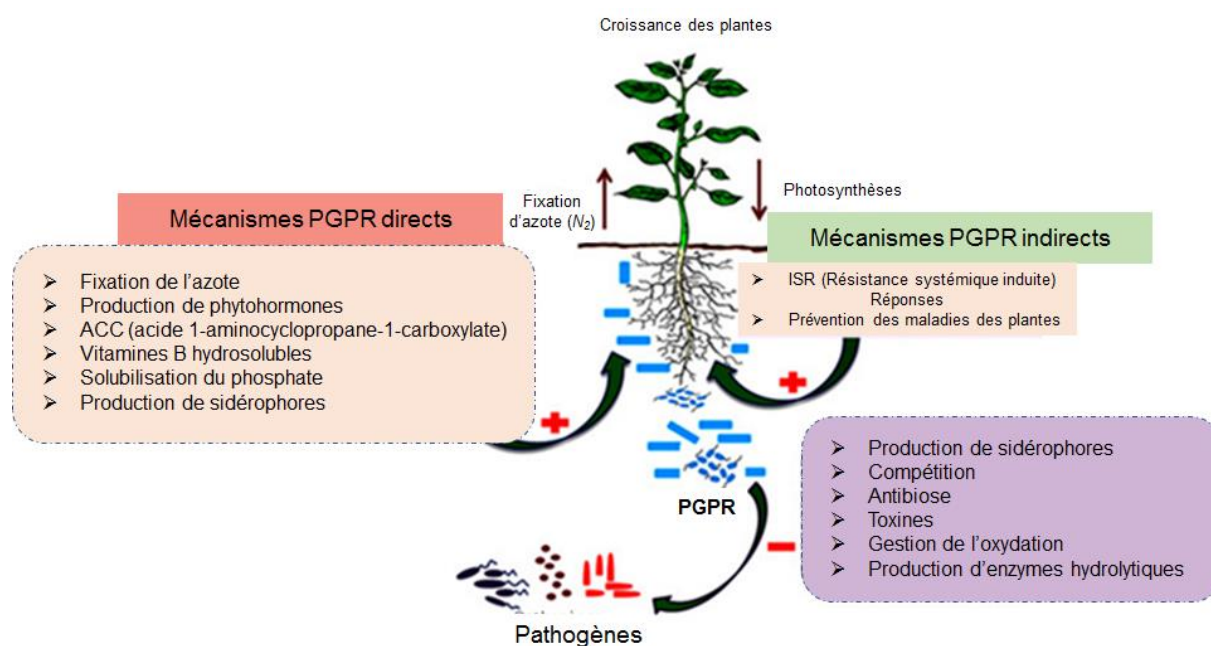


Figure I. 15. Effets des PGPR sur les plantes (adaptée de Chandran *et al.*, 2021).

❖ Fixateur d'azote

Bien que l'azote occupe une place prépondérante dans notre atmosphère sous forme gazeuse, il reste inaccessible aux plantes et aux animaux. Il doit être transformé en ammoniac pour que les plantes puissent l'assimiler. Cette transformation peut être réalisée par certaines PGPR dites diazotrophes fixatrices d'azote (Alleman & Peters, 2023) et qui possèdent un complexe enzymatique, la nitrogénase. Ce processus est appelé fixation biologique de l'azote. La nitrogénase fonctionne dans des conditions anaérobies et son activité nécessite de l'ATP et des électrons à faible potentiel (Alleman & Peters, 2023). Ces électrons issus de transporteurs très réducteurs, sont capables de fournir l'énergie nécessaire à la réduction de l'azote moléculaire

en ammoniac. Les *Frankia* sont l'une des bactéries fixatrices d'azote les plus connues (Sharma *et al.*, 2023b).

❖ Solubilisation du phosphate

Le phosphore est un macroélément nutritif essentiel pour les plantes. Il joue un rôle primordial dans la transmission de l'énergie indispensable pour leur croissance et leur productivité. Les phosphates sont présents dans le sol sous forme organique tels que les esters phosphoriques et inorganiques tels que les composés minéraux insolubles. Bien qu'il soit abondant dans le sol, il ne peut être absorbé par les plantes qu'après solubilisation. Ce phénomène désigne le potentiel des microorganismes à convertir le phosphate insoluble en une forme accessible aux plantes (Figure I.16).

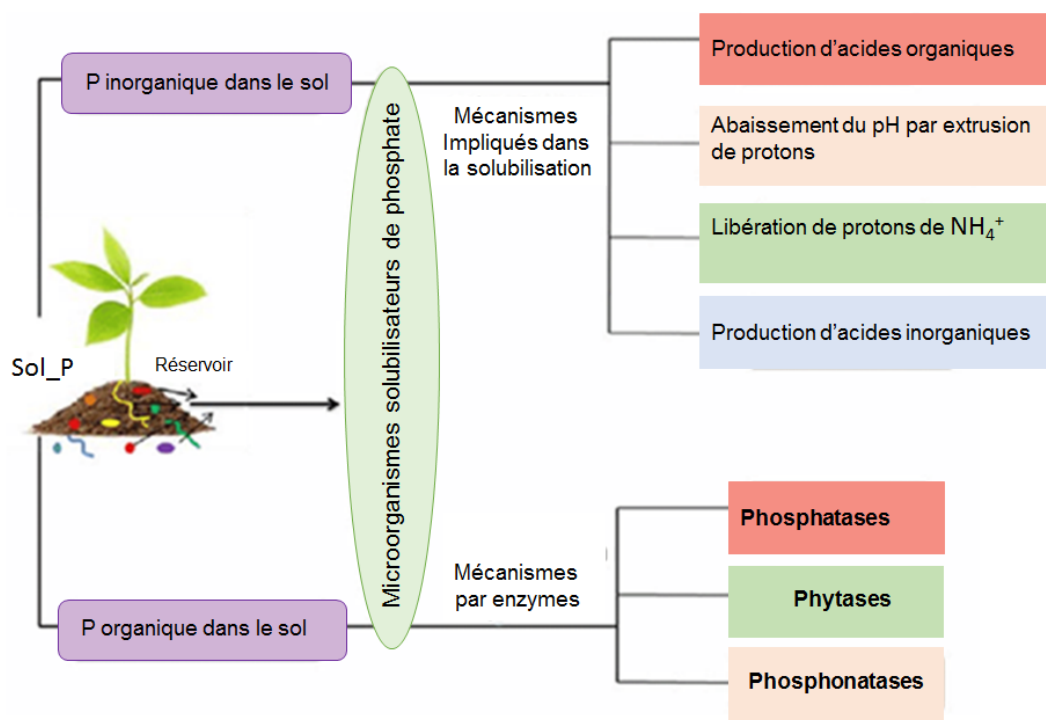


Figure I. 16. Mécanismes impliqués dans la solubilisation du P par les bactéries solubilisant le phosphate (adaptée de Prasad *et al.*, 2018).

Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate peuvent faciliter le développement des plantes en produisant des nutriments essentiels. Plusieurs souches bactériennes, en particulier des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* ont montré des capacités importantes de solubilisation du phosphate *via* la production d'acides organiques et la diminution du pH (Bahadir *et al.*, 2018 ; Tariq & Ahmed, 2024). En effet, la production des acides organiques entraîne la réduction du

pH du sol, facilitant ainsi la conversion des phosphates insolubles en formes solubles. En outre, certaines bactéries sont capables de chélater les ions métalliques en synthétisant des composés organiques spécifiques, tels que les sidérophores, les acides organiques et d'autres métabolites extracellulaires. Ils se lient aux cations métalliques tels que Fe^{3+} , Mn^{2+} et Al^{3+} présents dans les complexes minéraux du sol, en particulier ceux associés aux phosphates insolubles tels que le phosphate de fer ou d'aluminium, contribuant ainsi à la mobilisation du phosphate (Shakeela *et al.*, 2017).

❖ Production des sidérophores

Le fer fait partie des éléments vitaux pour les êtres vivants. Il est impliqué dans les réactions d'oxydo-réduction. Il est présent également dans certaines enzymes, notamment les cytochromes et les hydro-péroxydases, ainsi que dans la majorité des ribonucléases. Cet élément est présent dans le sol sous forme d'oxyde de fer, mais il est fréquemment un facteur limitant pour la croissance de la flore bactérienne et végétale. En raison de la faible biodisponibilité du fer dans la rhizosphère, la compétition entre les microorganismes augmente (Molnár *et al.*, 2023). Ainsi, les PGPR synthétisent des composés de faible poids moléculaire appelés les sidérophores. Plusieurs bactéries rhizosphériques telles que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, et *Klebsiella* sont capables de produire des sidérophores (Chitara *et al.*, 2021). Les sidérophores libérés permettent de chélater le fer pour former un complexe soluble de Fe^{3+} . Ce dernier ne peut être absorbé que par des microorganismes producteurs de fer ou dotés de récepteurs membranaires spécifiques pouvant le reconnaître et le transporter par un mécanisme actif (Briat, 1992). Bien que la spécificité des sidérophores soit principalement liée au fer, ils peuvent également complexer d'autres éléments trace métalliques toxiques tels que le cadmium et l'arsenic, en augmentant leur solubilité (Braud *et al.*, 2010). Par ailleurs, Sepehri et Khatabi (2021) ont inoculé de la luzerne exposée au Cd avec deux bactéries productrices de sidérophores. Ils ont observé une augmentation de la biomasse sèche de la plante par rapport aux témoins (sans inoculation). Les souches productrices de sidérophores peuvent donc réduire la toxicité des polluants présents dans les sols contaminés pour les plantes. En outre, elles participent à la production de biopesticides et d'agents de biocontrôle et favorisent la solubilisation du phosphate (Riaz *et al.*, 2021). Elles ont également d'autres fonctions biologiques, notamment l'amélioration de la fixation de l'azote et l'augmentation de la nodulation (Riaz *et al.*, 2021).

❖ Les régulateurs de croissance des plantes

Les régulateurs de croissance sont des substances qui interviennent sur certains mécanismes physiologiques, en particulier la différenciation et le prolongement racinaires, sans endommager la plante.

• Les phytohormones

Les phytohormones sont des agents chimiques qui influencent le comportement de la plante avec son environnement. Ces phytohormones produites par les PGPR peuvent accélérer les voies de signalisation en œuvre lors d'un stress, augmentant ainsi la résilience des plantes face à certains stress abiotiques tels que la salinité et la sécheresse (Ranjan *et al.*, 2024). Ces hormones favorisent également la production de métabolites secondaires à travers les voies de signalisation de l'éthylène et de l'acide jasmonique, ce qui renforce les mécanismes de défense de la plante contre les stress biotiques (Khan *et al.*, 2020). Par ailleurs, elles favorisent l'absorption hydrominérale par la plante, contribuant ainsi à des pratiques agricoles durables en réduisant la dépendance vis-à-vis des engrais chimiques (Arora *et al.*, 2013). On distingue cinq groupes principaux d'hormones : les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique. Parmi les auxines, l'acide indole-3-acétique (AIA) est la plus importante (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009).

L'acide indole-3-acétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus courante dans les plantes. Il est synthétisé par environ 80% des rhizobactéries retrouvées à la surface des graines ou des racines (Vessey, 2003). L'AIA est impliquée dans les premières étapes de l'embryogenèse. Il contrôle notamment l'organisation du méristème apical, la formation de la racine principale, l'initiation des racines latérales et des racines adventives, la ramification des parties aériennes de la plante et est également impliqué dans les tropismes en réponse à la gravité et à la lumière (Spaepen & Vanderleyden, 2011). Les *Bacillus* et les *Pseudomonades* peuvent produire de l'AIA, avec des concentrations variant de 36,66 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ à 84,12 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, dépendant de la souche bactérienne et des conditions environnementales (Randive *et al.*, 2024 ; Arzoo *et al.*, 2024). Parallèlement, il stimule l'1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) synthase afin de générer plus d'ACC qui sera transformé en éthylène par l'ACC oxydase (Mayak *et al.*, 2004). L'ACC désaminase hydrate ainsi l'ACC, ce qui inhibe la sécrétion d'éthylène. Par conséquent, l'effet final de la production d'éthylène sur la croissance racinaire dépendra de l'équilibre entre l'AIA et de l'ACC désaminase.

L'éthylène est une hormone végétale qui modifie la croissance des plantes et le comportement des cellules (Glick & Nascimento *et al.*, 2021). En cas de stress, la synthèse de cette phytohormone est importante et l'éthylène atteint des concentrations élevées, qui peuvent affecter la formation des racines et le métabolisme des plantes, et par conséquent, réduire le rendement des cultures (Manoj *et al.*, 2020). Ainsi, les souches bactériennes productrices de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase participent considérablement à la régulation des niveaux d'éthylène dans les tissus végétaux en dégradant l'ACC (précurseur de l'éthylène) en α -cétobutyrate et NH_3 . Ces deux produits peuvent être utilisés par la plante comme source de carbone et d'azote (Glick & Nascimento *et al.*, 2021 ; Gupta *et al.*, 2022). Plusieurs souches bactériennes peuvent produire des ACC désaminases, telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, et *Escherichia* (Manaj *et al.*, 2020).

Dans l'ensemble, ces différents mécanismes favorisent la croissance des plantes, en améliorant leur tolérance et leur comportement écophysiological dans des conditions défavorables.

4. Sites miniers en Tunisie : défis et stratégies de restauration

Les activités minières en Tunisie ont fortement influencé l'économie et l'environnement. Ce secteur, en particulier l'extraction du minerai de phosphate, a positionné la Tunisie en tant qu'acteur important sur le marché mondial. Cette croissance industrielle a également entraîné une dégradation de l'environnement et des défis sociaux, ce qui nécessite d'avoir une vision globale des futures pratiques d'exploitation minière.

4.1. Contexte des sites miniers en Tunisie

4.1.1. Historique de l'activité minière en Tunisie

En Tunisie, l'exploitation minière a débuté à la fin du 19^{ème} siècle, couvrant les périodes berbères, romaines, arabes, françaises et actuelles (Sainfeld, 1952). La période coloniale a été la principale période où le secteur a connu son essor, avec une exploitation intensive des minerais tels que le plomb, le zinc, le fer, le phosphate, le cuivre, l'argent, le mercure, le manganèse, la barytine et le fluor et des ressources énergétiques tels que le lignite et le pétrole. La production annuelle durant cette période exceptionnelle (de 1881 à 1956) est de 4000 tonnes de minerai de zinc, de 6000 tonnes de minerai de plomb et de 60000 tonnes de minerai de fer à la veille de la première guerre mondiale. Les premières exploitations de plomb-zinc en Tunisie

sont celles de Jebel Ressas en 1869 et de Jebba en 1874 (ONM, 2005). L'exploitation des phosphates a débuté en 1885 dans la région de Metlaoui, tandis que la production du fer a commencé en 1901 à Djebel Jerissa (OMN, 2005).

Dès 1956 (l'année de l'indépendance du pays), les activités minières ont pris une place importante dans l'économie tunisienne. Ce secteur a constitué la base de l'industrialisation diversifiée et performante du pays tels qu' El Fouledh en 1965 pour le fer et l'industrie chimique de fluor en 1976 pour le spath_fluor (ONM, 2005). Les années 90 ont été marquées par la fermeture de nombreuses mines tunisiennes, notamment Djebel Hallouf et Sidi Bou Aouan en 1990, Zriba et Hammam Jedidi en 1992. Les mines de Bou Grine, Fej Lahdoum et Bou Jabeur ont été ensuite fermées en 2005. Depuis 1994, la recherche dans ce secteur se concentre sur les opérations stratégiques de géologie et d'infrastructures minières afin d'encourager les opérateurs miniers à investir dans ce domaine. Ainsi, un inventaire géologique à l'échelle nationale a identifié 600 indices miniers, dont la plupart contiennent du plomb, du zinc et du fer (DGM, 2023). En 2007, l'exploration a été menée par Albidon Ltd et Maghreb Minerals, mais ce projet est resté non rentable et les mines de plomb et de zinc n'ont plus été exploitées par la suite (Ghorbel *et al.*, 2012). En 2018, il y a eu une reprise de la production de plomb-zinc avec l'ouverture des mines de kebbouch, Sidi Driss, Oued Djebss et Boukhil (DGM, 2023). Cependant, la production minière en Tunisie est actuellement réduite. En 2022, elle est principalement axée sur le phosphate ($4000 \cdot 10^3$ tonnes), le sel (NaCl) ($2000 \cdot 10^3$ tonnes), le gypse ($1000 \cdot 10^3$ tonnes), le fer ($200 \cdot 10^3$ tonnes), le sel (Na_2SO_4) ($30 \cdot 10^3$ tonnes), la barytine ($10 \cdot 10^3$ tonnes), et le plomb-zinc ($5 \cdot 10^3$ tonnes) (DGM, 2023). La production de fer est concentrée sur les gisements de Jérissa et de Tamra, dont la production a fortement diminué ces dernières années. Tandis que le phosphate se concentre dans le bassin minier de Gafsa (Ghorbel *et al.*, 2012 ; DGM, 2023).

4.1.2. Distribution géographique et spécificité des sites miniers en Tunisie

La Tunisie occupe une position géographique importante correspondant à l'extrémité orientale de la chaîne alpine nord-africaine et son nord fait partie intégrante de la chaîne alpine mobile de l'ouest de la Méditerranée (Piqué *et al.*, 2002). Grâce à sa position ouverte sur la Méditerranée, la Tunisie forme avec la Sicile une zone de transition entre les bassins oriental et occidental de la Méditerranée. Géologiquement, la position géographique de la Tunisie se situe

sur la bordure septentrionale du domaine cratonique saharien légèrement déformé. Elle est caractérisée par une grande richesse géologique et minéralogique.

La répartition des sites miniers en Tunisie est fortement liée à la géologie du pays, qui se caractérise par des formations géologiques variées favorisant l'accumulation de divers minerais.

On distingue 4 zones principales basées sur les unités structurales (Figure I.17) :

(1) Le domaine tellien, composé de la superposition d'unités allochtones résultant d'un événement tectonique néogène majeur (Bouaziz *et al.*, 2002) et caractérisé par la présence des gisements polymétalliques. Il se subdivise en deux secteurs : *i*) la zone des nappes où se situe le district minier de Nefza. Elle est marquée par la mise en place de nappes épaisses (Rouvier, 1994 ; Ben Ferjani *et al.*, 1990) contenant des sédiments profonds, des dépôts de type flysch ou molasse datés de l'Albien (Crétacé inférieur) au Burdigalien (Miocène) (Rouvier, 1994). Cette zone est caractérisée par un magmatisme bimodal de type acide puis basique d'âge Mio-Pliocène avec un potentiel métallique élevé tels que Pb, Zn, Fe, Cu, Hg, As, Sb et les métaux nobles. Les principaux exemples sont Tamra pour le Fe, Jebel Hallouf, Sidi Bou Aouan et Fej Hassene pour le Pb-Zn, Oued Maaden et Jebel Arja pour le Hg. *ii*) la zone des diapirs qui est caractérisée par la présence de dômes triasiques avec lesquels des minéralisations en Pb-Zn apparaissent fréquemment. Ces diapirs sont orientés dans une direction NE-SO et sont associés à la naissance de grandes failles de chevauchement (Bouaziz *et al.*, 2002). Cette zone est marquée par les gisements de Zn, Pb, Fe, Ba, Sr et Cu. Elle est associée au dôme triasique qui apparaît sous forme d'amas et de colonnes stratosphériques au sein de l'enveloppe du diapir et dans la zone de contact entre le Trias et la couverture (les formations bréchifiées de Cap-rock) (Bouaziz *et al.*, 2002). Les gisements les plus importants sont Bou Grine Fej Lahdoum, Sakiet Sidi Youssef, Garn Halfaya pour le Pb-Zn, Lakhouat pour le Pb, Jerissa pour le Fer (ONM, 2005).

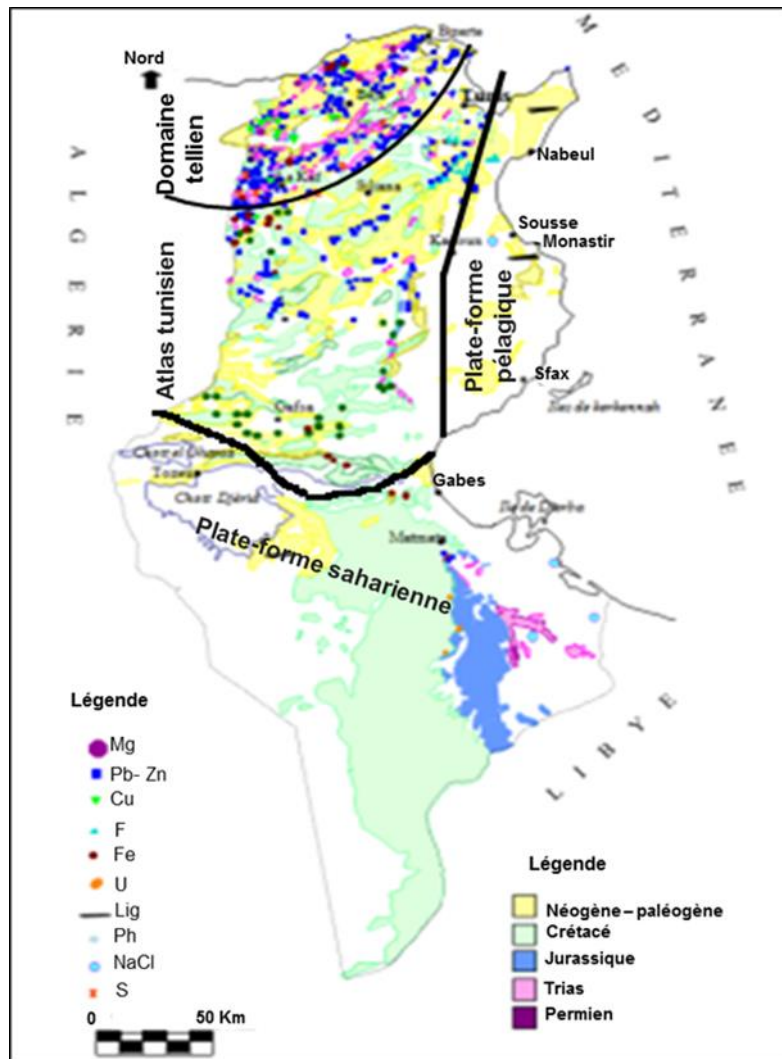


Figure I. 17. Distribution géographique des mines en Tunisie (DGM, 2023).

(2) l'Atlas tunisien est constitué de grandes structures plissées (NE-SO) qui sont localement interrompues par des grabens en subsidence, orientés NO-SE. Durant le Mésozoïque, cette période a été caractérisée par une diversité complexe de bassins et de rehauts, tels que l'Île de Kasserine (Jallouli & Mickus, 2000). Parmi les principaux sites miniers, on trouve Metlaoui, Kef Eddour, Redeyef et M'dhill.

(3) la plate-forme saharienne stable est constituée d'un socle métamorphique précambrien recouvert par une épaisse strate de sédiments clastiques marins du Paléozoïque. Cette zone occupe le sud de la Tunisie et présente un terrain relativement plat et stable. Elle possède des ressources en sel et en hydrocarbures, en particulier dans les régions de Chott el Jerid et de Gabès (Akrouit *et al.*, 2012 ; Bouaziz *et al.*, 2002).

(4) La plate-forme pélagique est une zone carbonatée. Elle est caractérisée par des sédiments d'âge méso-cénozoïque recoupés par des diapirs (Burollet, 1991). Elle est distincte de l'Atlas tunisien par un axe N-S de 100 km de longueur, composé d'une structure plissée associée à des failles, héritées des linéaments panafricains et paléozoïques (Bouaziz *et al.*, 2002). Cependant, elle est moins connue pour ses richesses minières.

Les sites miniers en Tunisie sont donc distribués dans diverses zones, dont chacune possède des particularités géologiques uniques. La proportion extraite des métaux varie d'un site à l'autre, notamment en fonction de la disponibilité des matières premières et de l'ampleur des opérations. Bien que la diversité des sites et des produits du secteur minier tunisien soit très prometteuse, la complexité géologique des sites miniers peut avoir une incidence sur la sécurité et la productivité.

4.1.3. Topologie des sites miniers abandonnés et actifs

Les sites miniers en Tunisie présentent une grande diversité topographique. Cette diversité est due à la géologie locale, à la nature des minerais ainsi qu'à l'histoire de leur exploitation. Cette diversité a été répartie en trois catégories :

(1) Les zones montagneuses et accidentées où les sites sont situés sur des pentes, des plateaux et des cuvettes, dont les altitudes sont variables, parfois supérieures à 900 m pour certains sites. Plusieurs sites miniers localisés dans les zones avec un relief marqué, en particulier dans les chaînes montagneuses du nord telles que le Djebel Hallouf pour le plomb-zinc, les mines de fer et de plomb abandonnées de Kef El Louz et de Sidi Bou Aïssa. Au centre-ouest de la Tunisie, on trouve les mines abandonnées de Bou Grine (Pb-Zn), et de Djebel Trozza pour le plomb.

(2) Les zones de plaines et de plateau, qui sont des zones peu accidentées, délimitées par des chaînes de montagnes ou des zones de dépressions. Le bassin de phosphate de Gafsa, par exemple, est situé sur le plateau de l'Atlas tunisien. Il est caractérisé par des anticlinaux et des synclinaux, avec une augmentation remarquable de l'épaisseur des couches de phosphate dans la partie nord-est de l'anticlinal de Tozeur-Nafta (Ouerghi, 2019 ; Ayachi *et al.*, 2016).

(3) Les zones désertiques et les sebkhas, notamment dans le sud de la Tunisie. Ces sites sont localisés sur des plaines désertiques, des plateaux ou près des sebkhas. Ces derniers sont des dépressions salines plates qui se forment dans des zones basses. Les zones désertiques et les sebkhas sont caractérisées par un terrain plat et ponctué de massifs et de cuestas isolés. C'est le cas, par exemple, du site actif de Chott El Jerid à Tozeur pour la production de sel et pour

l'exploitation d'évaporites comme le gypse à Sidi Bouzid et à Tataouine (Cherif *et al.*, 2018 ; Essefi *et al.*, 2021).

La topographie de la Tunisie est caractérisée par une grande variété de structures géologiques, de types de formations rocheuses et de reliefs. Le paysage est marqué à la fois par des reliefs naturels et par des altérations anthropiques, en particulier l'exploitation minière. Cette particularité affecte la dynamique des écosystèmes et entraîne des effets néfastes sur l'environnement.

5. Enjeux environnementaux des sites miniers en Tunisie

La répartition géographique des sites miniers en Tunisie révèle des activités concentrées principalement dans les régions du nord du pays, avec des implications environnementales importantes.

5.1. Niveaux de contamination et spéciation des ETM

Les niveaux de contamination et la spéciation des ETM soulèvent d'importantes préoccupations environnementales et sanitaires importantes, en particulier dans les zones touchées par les activités minières. En Tunisie, les sites miniers ont leurs propres caractéristiques, avec des niveaux élevés de contaminations et une grande diversité d'ETM retrouvés, ainsi qu'une spéciation complexe.

Plusieurs études révèlent que les activités minières ont provoqué des teneurs élevées en ETM en particulier en Pb, Zn et Cd dans les sols et les sédiments environnants, ce qui influence l'écosystème et la santé de la population locale. Le site minier abandonné de Jebel Ressaas représente l'un des sites les plus examinés en Tunisie par de nombreux chercheurs à cause de sa pollution intensive et durable. Les résidus miniers ont été conservés autour de terrains agricoles et des forêts. De fortes concentrations de métaux, en particulier pour le Cd, le Pb et le Zn, ont été relevées (Ghorbel, 2012, Elouear *et al.*, 2016, Alayet *et al.*, 2017, Mezned *et al.*, 2022). Selon l'étude de la spéciation des métaux, la migration est faible et ils sont principalement associés à des carbonates et à des composés peu solubles (Elouear *et al.*, 2016). Bien que les études menées soient nombreuses, l'étendue réelle de la pollution de cet ancien site minier est encore relativement sous-estimée. L'absence de surveillance et de mesures d'assainissement appropriées peut aggraver la situation environnementale de ce site. Elmayel *et al.* (2018) ont également montré que la mine de Trozza présentait des niveaux élevés de contamination par le Zn, le Pb et le Cd de 12480, 5950, et 123,25 mg.kg⁻¹ respectivement. Les

sols environnants sont également contaminés par ces trois métaux, dépassant largement les normes agricoles tunisiennes, ce qui indique une grave pollution de l'environnement. De même, le site minier de Sidi Ahmed a révélé des teneurs très élevées, en particulier en plomb et en zinc (Ayari & Charef, 2016). Le stockage des résidus miniers à l'air libre et sur les chantiers en Tunisie nécessite une bonne gestion en raison des graves conséquences que cela entraîne. Les mines abandonnées de Jebel Hallouf, Sidi Bouaouane, Jebel Ghazlane, Hammam Zriba et Jalta, par exemple, contiennent de grandes quantités de résidus de flottation. Le sol et les résidus sont fortement contaminés par As, Sb, Cd, Pb et Zn (Ashour *et al.*, 2022). Par ailleurs, la spéciation des ETM dans les sites miniers est fortement liée à la topographie de la zone, ainsi qu'à l'érosion et aux vents dominants (Mezned *et al.*, 2022 ; Nassraoui *et al.*, 2022 ; Trifi *et al.*, 2019). Cette situation peut entraîner la dispersion des ETM sur de longues distances, la contamination des eaux souterraines et la dégradation de l'écosystème. La plupart des études réalisées soulignent le besoin urgent de plans de gestion environnementale (Trifi *et al.*, 2019 ; Mezned *et al.*, 2022 ; Nassraoui *et al.*, 2022)

En Tunisie, l'accent a été mis sur les études de la spéciation et de la contamination minière sur la plupart des sites, mais la majorité des recherches se limitent à des publications et à des expériences en laboratoire, avec peu d'investissements dans la restauration sur le terrain. Il est donc essentiel de prendre en compte le potentiel de restauration et de gestion durable de ces sites.

5.2. Biodiversité et dégradation des écosystèmes

La biodiversité représente la variété des organismes vivants, sous leurs différentes formes (Stange *et al.*, 2021). Depuis des années, cette biodiversité se réduit de manière inquiétante. Les principales causes de la dégradation environnementale sont les activités humaines et la pollution par les ETM (Bisht *et al.*, 2020). Ainsi, la pollution métallique et la perte de la biodiversité sont deux crises écologiques majeures de ce siècle, menaçant le fonctionnement des écosystèmes.

Le secteur minier en Tunisie, comme dans de nombreux pays du monde, est l'une des sources principales de contamination par les ETM. Il peut affecter les communautés microbiennes du sol, en diminuant leur biodiversité (Yousfi *et al.*, 2019). Cela perturbe leurs fonctions essentielles au cycle des nutriments et à la décomposition de la MO (Elouear *et al.*, 2016). En revanche, la diversité bactérienne des régions d'extraction minière est parfois importante, comme les régions d'extraction de phosphate à Sfax et à Gafsa (Thabet *et al.*, 2017). Cela peut

être dû à une adaptation mutuelle dans des milieux pollués et pauvres en nutriments. Ainsi, seules les bactéries métaboliquement tolérantes et écologiquement adaptées peuvent résister et prospérer.

En outre, les ETM peuvent affecter les différents organes de la plante ainsi que leurs fonctions biochimiques et physiologiques, ainsi que les membranes cellulaires, les noyaux et l'ADN (Cortés-Eslava *et al.*, 2018). De plus, ils peuvent affecter la qualité de l'atmosphère et des eaux. Ainsi, ils peuvent menacer la santé et la vie des organismes vivants de la flore et de la faune terrestres et aquatiques (Monchanin *et al.*, 2021). En effet, les éléments toxiques ont un impact négatif sur la santé humaine en cas de contact, d'ingestion ou d'inhalation. Même les éléments essentiels au fonctionnement des organismes vivants, tels que Zn, Fe, et Cu, peuvent avoir toute une série de conséquences néfastes s'ils sont consommés en excès. (Bibi *et al.*, 2023). Ainsi, la bioaccumulation et la bioamplification des ETM peuvent entraîner la perturbation des écosystèmes aquatiques et terrestres (Talukder *et al.*, 2022).

5.3. Défis et perspectives de la réhabilitation des sites miniers en Tunisie

La réhabilitation des sites miniers en Tunisie constitue un enjeu environnemental et sanitaire majeur, confrontée à un certain nombre de défis. En effet, de nombreux travaux récents ont signalé des taux de pollution élevés en ETM sur la majorité de ces mines (Trifi *et al.*, 2019 ; Elmayel *et al.*, 2019 ; Nouairi *et al.*, 2021 ; Ben Garali *et al.*, 2024 ; Hamed *et al.*, 2024). Ces polluants représentent un risque toxique majeur pour les populations avoisinantes et les zones de proximité du site. Le transfert des polluants vers les aquifères et les zones agricoles voisines (Hidouri *et al.*, 2023 ; Hamed *et al.*, 2024) pose certes des risques de contamination dans la chaîne alimentaire. Malheureusement, la plupart des mines en Tunisie s'accompagnent souvent d'un développement démographique notable. Par conséquent, l'exposition chronique aux ETM a été signalée comme source de risques sanitaires pour les populations riveraines (Khelifi *et al.*, 2021 ; Ayari *et al.*, 2023). Par ailleurs, le contexte climatique semi-aride qui prévaut sur les zones minières en Tunisie accentue les conditions contraignantes. Ce régime général a été considéré comme un facteur aggravant dans le transfert des éléments traces à travers les retombées atmosphériques et les eaux de ruissellement (Doumas *et al.*, 2018), limite considérablement le développement et la régénération naturelle du couvert végétal. Cette contrainte écologique limite sensiblement la mise en œuvre des stratégies de réhabilitation (Li *et al.*, 2021). Face à une double contrainte, chimique et climatique, la réhabilitation des sites

miniers nécessite impérativement de l'expérience en matière d'environnement, et des compétences spécifiques dans les domaines de phytoremédiation, de gestion des déchets miniers et en écologie appliquée. En Tunisie, le rythme des pratiques de restauration *in situ* est lent (ONM, 2019), ce qui entrave la mise en œuvre de solutions appropriées. De plus, malgré les efforts pour renforcer la réglementation environnementale, il existe encore des lacunes, en particulier sur la protection de la population locale et des écosystèmes (ONM, 2019). La résolution de ces défis nécessite une stratégie à multiples facettes. En premier lieu, il est recommandé d'intégrer la restauration des sites miniers dans une stratégie nationale de gestion environnementale et de développement durable (Chen *et al.*, 2022). De plus, la collaboration entre la science, les autorités locales, les sociétés minières et les communautés locales est indispensable pour renforcer l'efficacité des actions d'assainissement et garantir le choix de méthodes de dépollution à la fois performantes et économiquement viables. La phytoremédiation est l'une des méthodes innovantes et moins coûteuses les plus utilisées dans le monde. Le choix des plantes devra être adapté aux conditions locales (Maiti *et al.*, 2021 ; Young *et al.*, 2022). Il est donc nécessaire de s'appuyer sur les résultats d'études de laboratoire et sur les succès internationaux qui ont démontré leur efficacité, pour réduire la toxicité des ETM. En outre, l'ajout d'amendements organiques tels que le biochar et le compost peuvent améliorer la fertilité du sol et des résidus contaminés, et stabiliser les ETM en facilitant la croissance des plantes (Hassan *et al.*, 2023). De même, des études récentes soulignent la combinaison de la restauration microbienne, de la phytoremédiation et des méthodes d'amélioration des sols pour obtenir un bon rapport coût-efficacité et des résultats bénéfiques pour l'environnement (Xu *et al.*, 2023).

Bien que les défis restent considérables, l'intégration de méthodes de restauration innovantes et de cadres politiques solides offre une opportunité de restaurer plus efficacement les sites miniers en Tunisie. Toutefois, la compréhension de ces défis exige des recherches continues et un engagement des sociétés minières, de la communauté locale et des acteurs institutionnels, afin de garantir la mise en œuvre efficace de pratiques durables.

5.4. Études de cas et expériences internationales

La restauration des sites miniers est une approche visant à corriger les dégâts causés par l'exploitation minière en restaurant des écosystèmes indigènes fonctionnels. Elle nécessite une connaissance approfondie des mécanismes écologiques et des techniques innovantes afin

d'assurer la durabilité environnementale et sociale. Dans ce cadre, plusieurs approches techniques ont été menées pour répondre aux enjeux de la réhabilitation des sites miniers. La remise en état du sol est le meilleur moyen de restaurer sa productivité (Rathi *et al.*, 2024). Elle est couramment appliquée pour revégétaliser des sols hautement toxiques, et/ou fortement acides ou basiques. L'utilisation de systèmes humides artificiels a permis la revégétalisation de la zone contaminée et la réduction de la biodisponibilité des ETM. En outre, l'utilisation d'espèces végétales fixatrices d'azote est l'une des techniques la plus appliquée dans les sites miniers. Dans certains cas, elles peuvent être plantées directement sur le sol brut contaminé afin de stabiliser les ETM (Jach *et al.*, 2022). Par ailleurs, des essais de revégétalisation ont été menés à la mine de Porto Trombetas au Brésil (Roux, 2002). Dans cette étude, les auteurs démontrent que la croissance des légumineuses nodulantes est plus rapide que celle des légumineuses non nodulantes. Il est recommandé, dans ce cas, de revégétaliser les sites contaminés avec des espèces nodulantes mais également mycorhizées (Franco *et al.*, 1995), telles que le cas d'une dune de sable côtière dégradée située en Algérie (Bouazza *et al.*, 2015). Par ailleurs, la dégradation des sites miniers et la carence en éléments nutritifs nécessitent le recours à des amendements des sols. La chaux est un amendement calcique permettant de neutraliser l'acidité, et réduire la biodisponibilité des ETM (Singh *et al.*, 2020). Par exemple, dans la mine de Sudbury au Canada, la restauration a été effectuée à l'aide d'un mélange de plantes herbacées et de légumineuses, de chaux et d'engrais. Les engrais fournissent des éléments nutritifs assimilables tels que N, P et K afin de faciliter la croissance des plantes (Singh *et al.*, 2020). De même, l'ajout d'engrais a favorisé l'établissement d'un couvert végétal à la mine d'Eneabba en Australie (Osborne & Schatral, 1997). En outre, l'implantation d'espèces légumineuses seules ou associées, permet de diminuer les applications d'engrais (Jach *et al.*, 2022). Cette capacité s'explique par leur association symbiotique avec les bactéries fixatrices d'azote. Ces bactéries permettent aux espèces végétales de prospérer dans les sols pauvres en matières organiques. Par exemple, en Guyane, la phytoremédiation de la mine d'or de Boulanger a été menée à l'aide d'*Acacia mangium* et *Clitoria racemosa* (Couic *et al.*, 2018). Ces espèces améliorent la qualité du sol en élevant l'activité microbienne et en limitant la mobilité du mercure. Bien que l'effet de ces espèces ait été évalué pendant une longue période, peu de détails sont connus sur leur conséquence sur d'autres éléments toxiques. Ces essais internationaux de réhabilitation des sites miniers à grande échelle sont des exemples de pratiques écologiques et

techniques applicables. Ces techniques de traitement pourraient être adaptées aux conditions pédoclimatiques et polluantes rencontrées dans certains sites miniers en Tunisie.

Les connaissances actuelles et les techniques de restauration laissent penser qu'elles sont au stade de la démonstration à l'échelle du terrain (Chen *et al.*, 2022). Des efforts de recherche appliquée demeurent indispensables pour approfondir les connaissances scientifiques sur ces méthodes de gestion des sites miniers.

6. Caractéristiques géographiques et environnementales de la zone d'étude : la mine de Tamra

En Tunisie septentrionale, la zone des nappes de charriage, caractérisée par un contexte géologique prédominant, favorise la minéralisation du plomb-zinc et du fer (Decrée *et al.*, 2008b ; Bouzid *et al.*, 2018).

6. 1. Contexte historique et exploitation minière

La mine de fer de Tamra est connue depuis l'époque romaine (Berthon, 1922 ; Decrée *et al.*, 2008b). Son exploitation industrielle a débuté à la fin du 19^e siècle. Selon l'office national des mines en Tunisie, cette mine couvre une superficie d'environ 3280 hectares et comprend plusieurs gisements, notamment ceux d'Aïn Rechech et de Gannara ainsi qu'un chantier à dominante manganésifère. Ce dernier a été identifié comme une zone d'une ancienne exploitation de minerai de Mn communément appelée zone Mn ou chantier manganésifère (Bouzouada, 1992 ; Negra, 1987). Actuellement, seuls les gisements d'Ain Rechech (à l'ouest de la mine) et le chantier manganésifère (à l'est de la mine) sont en exploitation, tandis que le gisement de Gannara est depuis longtemps abandonné. La mine était desservie au 19^e siècle par le chemin de fer qui relie la ville de Tabarka à celle de Bizerte. En 1901, les activités de la compagnie métallifère ont débuté par l'exploitation exclusive du minerai de fer. Elle change officiellement son nom pour devenir en décembre 1905 la société Djebel Djerissa (SDD), nationalisée le 1^{er} janvier 1965. Elle se compose de deux pôles de production : (1) la mine de Tamra-Douahria et (2) les mines de Djebel Djerissa et Djebel Hmaïma.

La qualité de minerai de fer de Tamra est faible, car il contient environ 1 % d'As (Decrée *et al.*, 2008a). Il est estimé en 1950 à 1,6 Mt avec une teneur moyenne de 50 % Fe (Decrée *et al.*, 2008a). En 2021, les réserves de fer de cette mine ont été estimées par SDD à environ 35 Mt.

Aujourd'hui, cette mine à ciel ouvert est la dernière encore exploitée en Tunisie. Le minerai est destiné principalement au secteur des cimenteries locales où il est utilisé comme additif dans la fabrication du ciment.

6.2. Contexte géographique et géologique

La zone d'étude est située au nord-ouest de la Tunisie, à environ 11 km au nord-ouest de la ville de Nefza (Figure I.18). La mine de fer de Tamra s'inscrit dans un ensemble de gisements métallifères constituant le district minier de Nefza. Ce dernier est marqué par la présence de structures diapiriques triasiques, de nappes néogènes ainsi que par un magmatisme d'âge Miocène (Decrée *et al.*, 2008b).

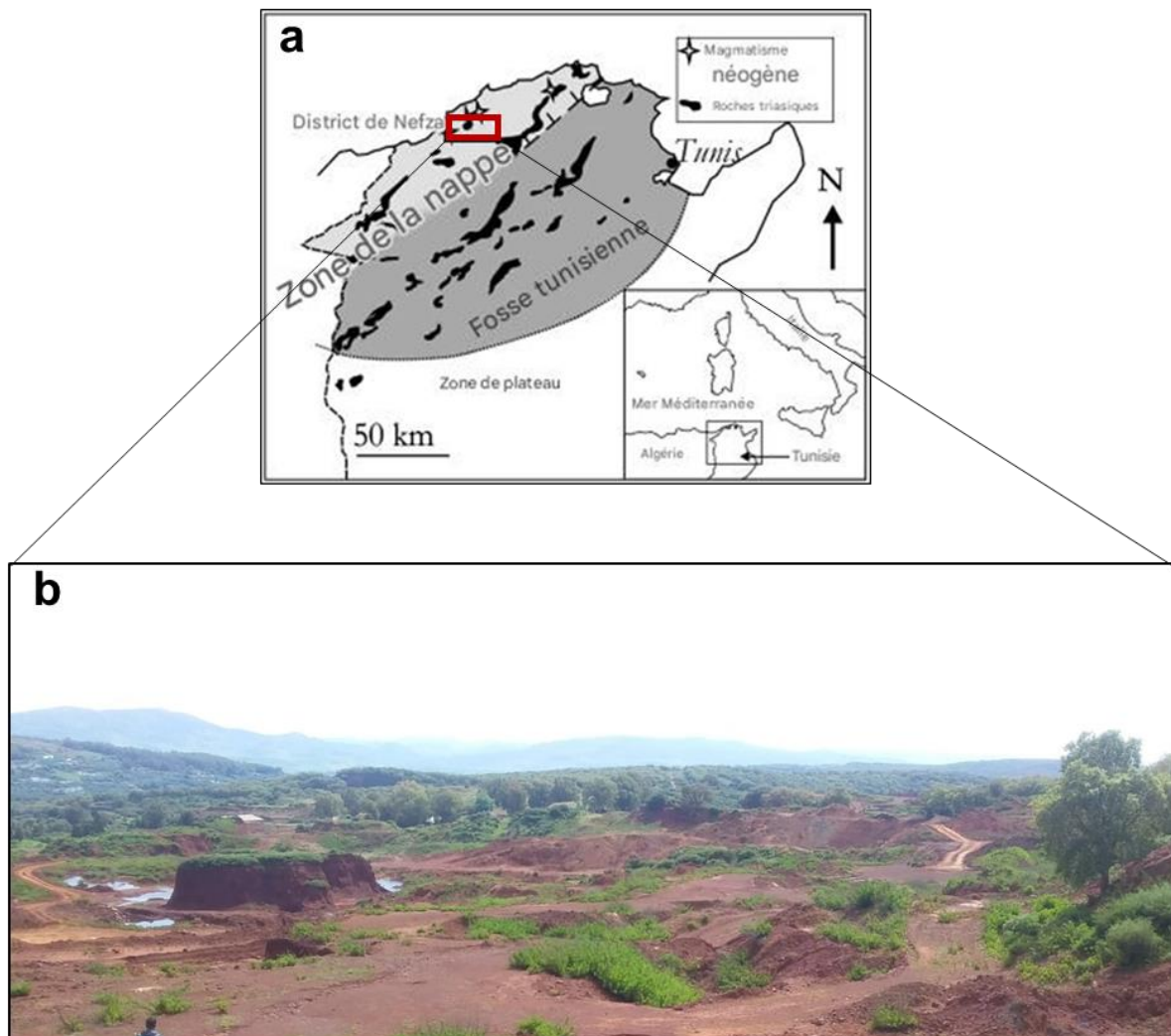


Figure I. 18. a) Localisation du district de Nefza dans les principales unités tectonosédimentaires du nord de la Tunisie (adaptée de Decrée *et al.*, 2008b modifiée d'après Rouvier *et al.*, 1985 ; Savelli, 2002) ; **b)** vue panoramique du site minier de Tamra (AO©, 2022)

Chapitre I. Synthèse bibliographique

La mine s'inscrit dans la structure complexe d'Oued Belif (Decrée *et al.*, 2013). Cette zone se caractérise par une histoire géologique complexe impliquant des processus magmatiques et hydrothermaux (Dekoninck *et al.*, 2018). Elle fait également partie du bassin de Sidi Driss-Tamra-Guanara, dont les dépôts sédimentaires renferment du matériel triasique remanié ainsi que des dépôts pyroclastiques (Figure I.19). Ces derniers suggèrent, par conséquent, un volcanisme explosif contemporain (Negra, 1987).

Ce site minier est considéré comme un gisement économique d'oxydes de fer latéritiques (Decrée *et al.*, 2008a). La couleur rougeâtre du sol de la zone d'étude indique la forte présence d'oxyde de fer, principalement de l'hématite et de la goethite (Bouzidi *et al.*, 2022).

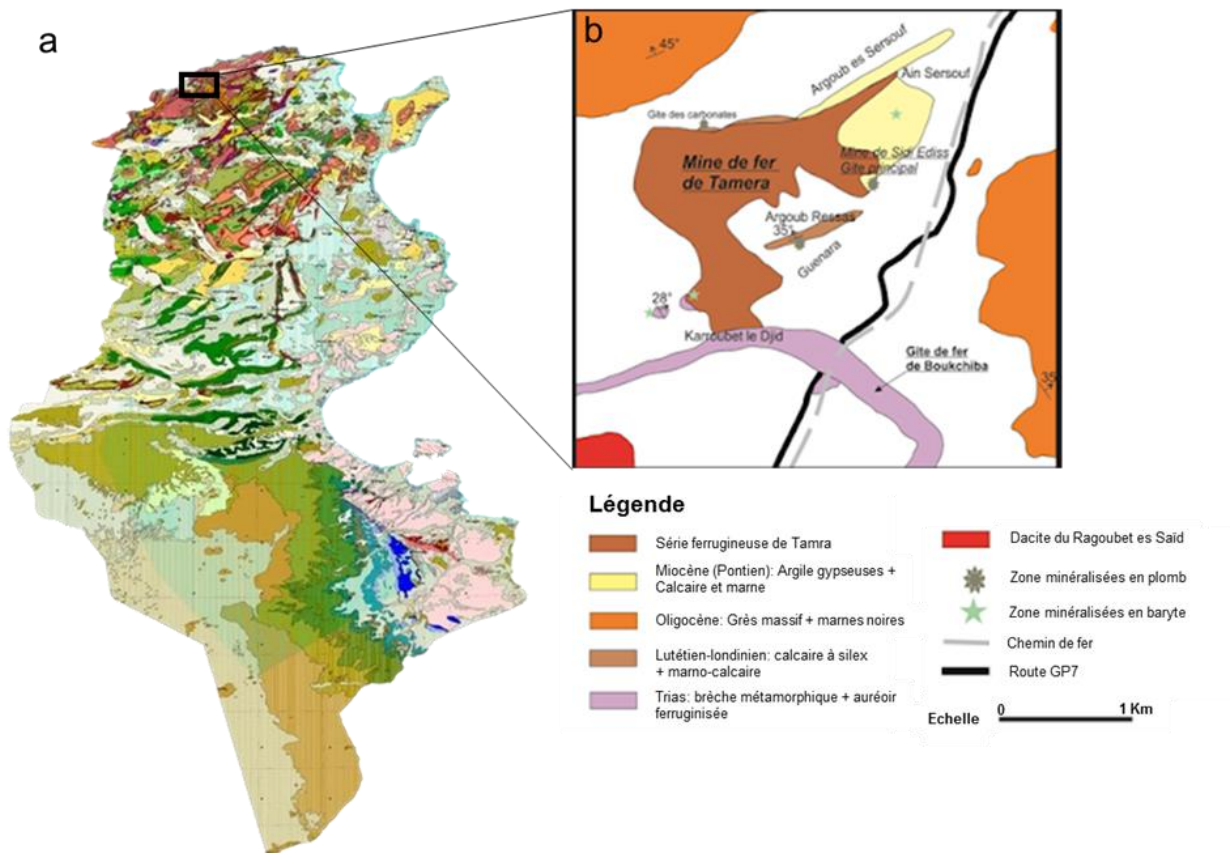


Figure I. 19. a) Localisation de la mine de Tamra sur la carte géologique nationale ; b) Carte géologique de la mine de Tamra (d'après Gottis, 1952).

L'origine du gisement de Tamra a fait l'objet de plusieurs hypothèses. Gottis (1952) et Dermech (1990) ont proposé la substitution du fer dans les sédiments Messiniens en relation avec les sulfures Fe-Pb-Zn sous-jacents à Sidi Driss comme origine de sa genèse. Durant la période de transition entre la fin du Miocène et le début du Pliocène, des plis à axe NE-SO ont été créés

dans des dépressions syn-orogéniques de l'avant-pays, notamment dans le bassin de Tamra-Sidi Driss. Le bassin de Sidi Driss se décrit comme un synclinal comportant des failles longitudinales NE-SO. Ces failles sont restées actives pendant la sédimentation (Dermech, 1990). À ce stade, les marnes représentent les roches dominantes avec des intercalations de plusieurs conglomérats, de calcaires supratidaux, d'évaporites et de couches de célestine (Dermech, 1990). Ce bassin est recouvert en discordance par des formations ferrugineuses mio-pliocènes qui constituent le bassin de Tamra (Figure I.20a).

La minéralisation en sulfures de Pb-Zn de ces deux bassins se trouve dans des calcaires marins peu profonds présentant le même faciès sédimentologique.

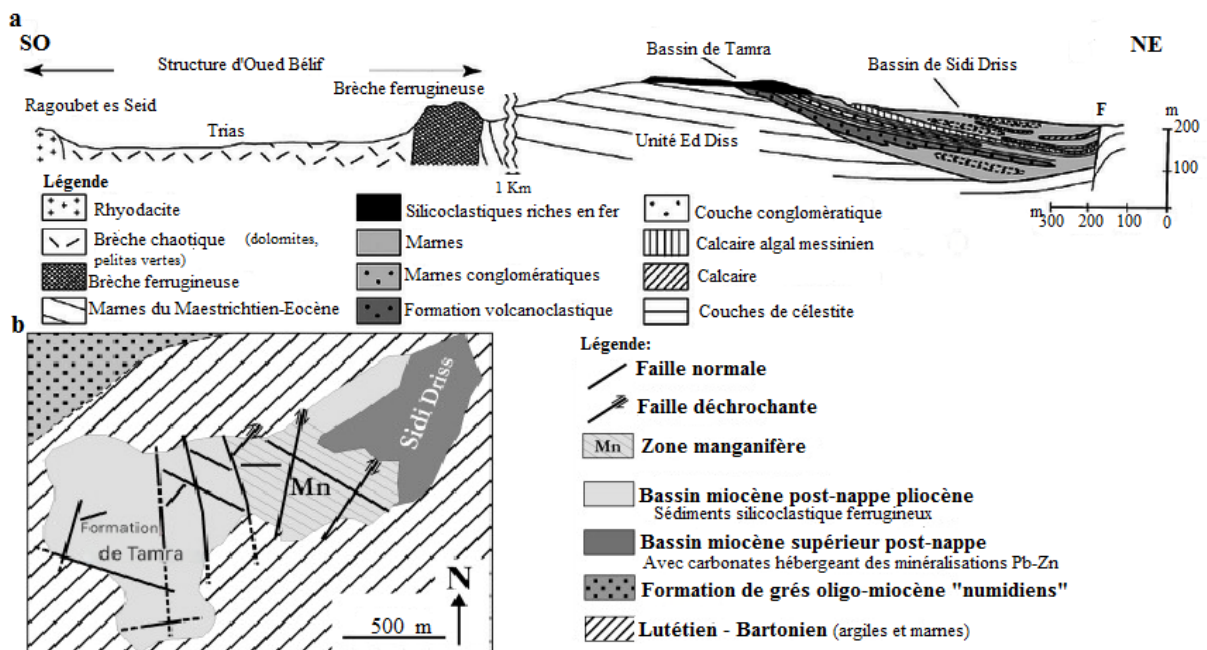


Figure I. 20. a) Coupe transversale de la zone de Sidi Driss –Tamra (adaptée de Decrée *et al.*, 2008) ; **b)** Carte structurale de la mine de fer de Tamra (adaptée d'après Gottis & Sainfeld, 1952 ; Rovier, 1987 et Bouzouada, 1992).

Selon Negra (1987), la formation du minerai de fer de Tamra résulte de la mise en place de gossan sur des sulfures hypogènes accompagnée d'une minéralisation hydrothermale associée au magmatisme néogène. Cependant, Decrée *et al.* (2008a) attribut l'âge du gisement au Mio-Pliocène. Il résulte d'une combinaison de préconcentration pédogénétique, suivie d'un dépôt hydrothermal de fer dans un bassin superposé à celui de Sidi Driss. En effet, Decrée *et al.* (2008b) ont suggéré que l'altération et/ou la pédogenèse provoquées par la percolation vers le bas de fluides météoriques expliquerait la majeure partie de la concentration initiale en fer.

Cependant, la superposition hydrothermale associée aux roches magmatiques miocènes voisines et aux gisements minéraux correspondants à la mine de Fe-Pb-Zn de Sidi Driss, expliquerait l'enrichissement extrême en fer actuel (Decrée *et al.*, 2008a).

Le gradient thermique peut favoriser le mélange des fluides météoriques oxydants de surface et des fluides hydrothermaux tièdes réductifs profonds (Stefanov & Ouchev, 1972 ; Decrée *et al.*, 2008b ; Dekoninck *et al.*, 2018). Ces apports hydrothermaux entraînent ainsi la précipitation de minéralisations riches en Mn, Pb, Zn et Ba. Son association avec le seuil magmatique peu profond a bénéficié de la fragilité de la lithosphère et de la présence d'une zone de fracture profonde (Jallouli *et al.*, 1996).

Sur le plan structural, la mine de Tamra est formée de brèches tectoniques avec des minéraux riches en Mn et de fortes teneurs en Fe (Negra, 1987). Elle est caractérisée par la présence de failles et de linéaments orientés NE-SO, N-S et E-O (Figure I.20b).

Ces traits structuraux s'inscrivent dans le cadre d'une dynamique tectonique régionale complexe en Tunisie. Cette dernière a connu de multiples phases à la fois d'extension et de compression depuis le Mésozoïque (Ayed, 1986).

La formation de Tamra a une épaisseur d'environ 50 m, marquée par des discontinuités lithologiques liées à la complexité géologique de la région (Decrée *et al.*, 2008b). Ses couches supérieures se confondent avec la couverture récente de sol rouge, à travers un horizon caractérisé par des éboulis fragiles. Cette formation est composée de cinq lithologies principales facilement différenciables par leur composition minéralogique et leur degré de durcissement, ainsi que par leur nature sédimentaire (Figure I.21) :

- Lithologie 1 : composée par des couches d'argile grise, marbrée et fissurée, avec des taches rouges et blanches. Ces couches contiennent principalement de la kaolinite (60 – 80 %), de l'illite (10 – 25 %) et de l'illite-smectite associée (5 – 15 %).
- Lithologie 2 : constituée des sédiments argileux ou limoneux jaunâtres (ocre), faiblement indurés, formés principalement de goethite.
- Lithologie 3 : regroupe des sédiments argileux ou limoneux rougeâtres entièrement similaires à ceux de la lithologie 2, mais constitués principalement d'hématite.
- Lithologie 4 : composée par des sédiments concrétionnaires fortement indurés, présentant des blocs abondants d'hématite ou de goethite.

- Lithologie 5 : constituée des bandes épaisses contenant du quartz et de l'hématite fortement indurés. Elle se caractérise par une faible proportion de kaolinite (25 %) et une forte proportion d'illite (40 %), ainsi que des couches mixtes (20 %).

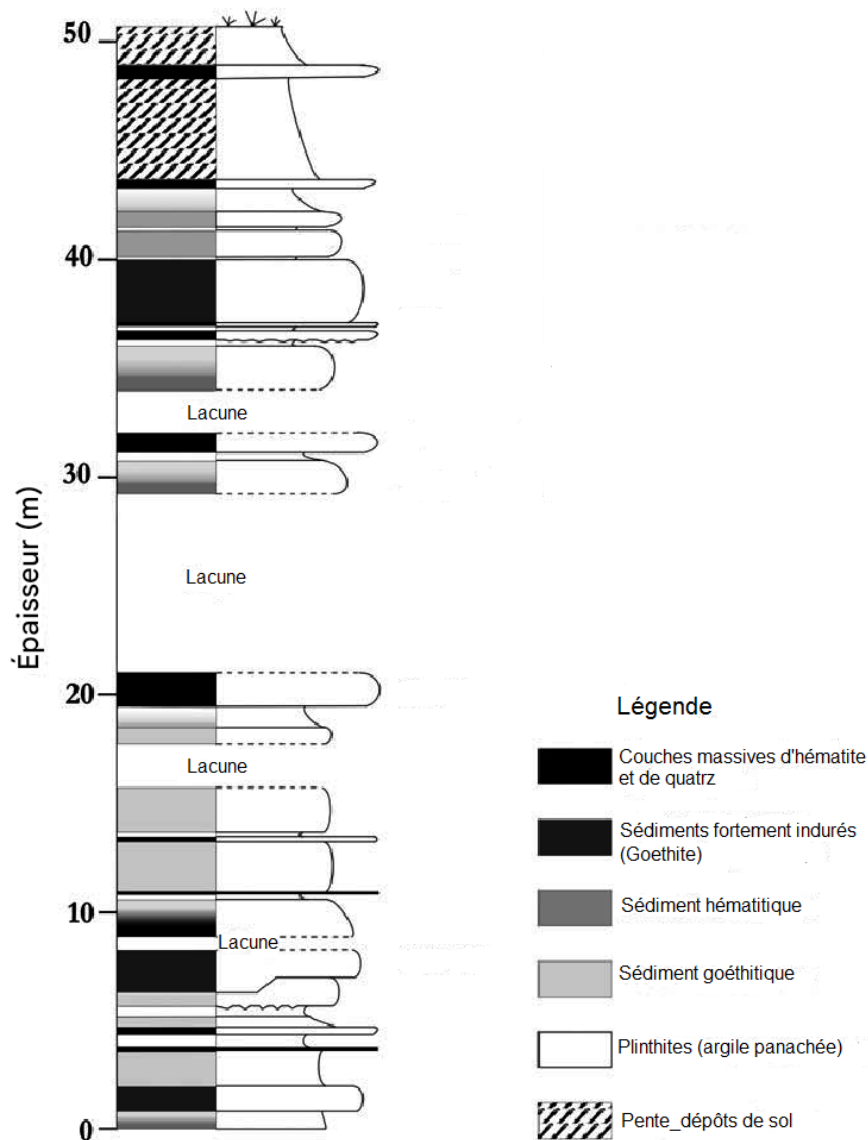


Figure I. 21. Log lithologique de la mine de Tamra (adaptée d'après Decrée *et al.*, 2008b).

6.3. Caractéristiques climatologiques et hydrographiques

La mine de fer de Tamra est caractérisée par un climat méditerranéen marqué par des étés secs et venteux et de fortes précipitations hivernales. Une étude menée sur les statistiques

pluviométriques par station sur une période de six ans entre 2017 et 2022 a permis de collecter les données météorologiques présentées auprès de l'Institut National de Météorologie de Tunis (INM). La station météorologique la plus proche de la mine de Tamra est située à Bizerte. En général, les températures oscillent entre 13°C et 27°C tout au long de l'année, avec des valeurs extrêmes allant rarement en dessous de 5°C et pouvant culminer à 43°C. La moyenne annuelle des précipitations est d'environ 552 mm. La période la plus chaude s'étale de juillet à septembre, tandis que la période froide couvre les mois de janvier à mars (NIM, 2024).

Ce type de climat peut influencer la migration des ETM présents dans le site. En effet, ces polluants peuvent être soumis à la fois à l'érosion éolienne lors de périodes sèches et venteuses et à l'érosion hydraulique lors de fortes pluies (Trifi *et al.*, 2022).

Par ailleurs, ce site minier est caractérisé par un système hydrographique dense comprenant trois sources d'eau : i) Ain El Mota à proximité de la zone Mn ou le chantier manganésifère ; ii) Ain El Bell située au sud du site minier ; et iii) Ain Rechech qui coule dans la zone de contact entre le minerai et les marnes imperméables du socle d'Ed Diss à l'extrême ouest de la mine de Tamra (Decrée *et al.*, 2010). Ces trois sources sont utilisées par la population locale comme source d'eau potable. Elles font également partie du système hydrographique local, en particulier d'Oued Belif.

6.4. Problématiques environnementales associées à l'exploitation de la mine de Tamra du site

La mine de fer de Tamra est de première importance dans le développement économique de la Tunisie. Cependant, étant une exploitation à ciel ouvert, caractérisée par des fortes concentrations en métaux et métalloïdes, la mine présente une vulnérabilité accrue aux aléas climatiques. Ceci peut entraîner des effets néfastes sur l'environnement et la santé de la population locale.

En effet, la population locale utilise régulièrement les trois sources (Ain El Mota, Ain El Bell et Ain Rechech) pour s'approvisionner en eau potable. Bien que Decrée *et al.*, (2010) ont montré que ces trois sources pouvaient être qualifiées d'eau potable selon les normes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le gradient thermique de la région, la période d'échantillonnage, le changement climatique de ces dernières années ainsi que la dégradation progressive du site pourraient affecter la dynamique des fluides souterrains et la mobilisation des ETM à long terme (Liu *et al.*, 2023 ; Byrne *et al.*, 2020). De plus, la présence des éléments toxiques, tels que l'As

et le Cd, n'a pas encore fait l'objet d'études (Decrée *et al.*, 2010). De plus, ces trois sources font partie du réseau hydrographique d'Oued Belif. Celui-ci a été identifié comme source de pollution, notamment en As et en Pb, affectant les eaux de la retenue du barrage de Sidi El Barrak (Abid *et al.*, 2006). Ce barrage est un réservoir d'eau potable, qui fournit 190 millions de mètres cubes par an pour l'irrigation, l'alimentation en eau potable du grand Tunis, Sahel et Sfax et l'amélioration des eaux du canal de Medjerda Cap Bon. En outre, les eaux pluviales lessivent les sites d'extraction issues d'exploitation de minerai, en particulier de fer, ce qui représentent la principale cause de pollution des eaux de surface (Kamat & Sankaranarayanan, 1975). Cette pollution est due à l'excès de particules turbides telles que les matières colloïdales et de fer soluble (Fe^{+2}) (Kamat & Sankaranarayanan, 1975). Cependant, l'exploitation minière ne constitue pas uniquement une source de pollution pour les eaux de surface, mais également elle contamine les eaux souterraines, comme l'a démontré l'inondation de la mine de Kherzet Youssef en Algérie (Bellouche, 2016).

Le stockage provisoire du minerai (avant le transport vers les cimenteries) et des terrils, sur le site d'étude, peut perturber l'écosystème. En effet, l'observation sur le terrain a révélé la présence de deux types de terrils, stockés directement sur la couche arable, à l'air libre et sans dispositifs de confinement ou de protection-(Figure I.22) : *i*) le premier sert à la fabrication de briques rouges par la Société Industrielle de Bloc (SOIB), dont la teneur en fer varie entre 14 et 16 % ; et *ii*) le second sert à la fabrication d'antiquités par les étudiants de l'Institut Supérieur des Arts et Métiers de Sidi Bouzid, dont la teneur en Fe est inférieure à 11 %. Les minerais sont ensuite transportés vers les cimenteries du pays par des camions non bâchés, des particules fines ou des poussières rouges risquent d'être dispersées dans l'air pendant le transport, augmentant ainsi l'ampleur de la pollution. Par ailleurs, les principales phases porteuses des ETM présents dans la mine de Tamra sont des oxydes et hydroxydes de fer tels que l'hématite et la goethite, ainsi que des minéraux argileux (Bouzidi *et al.*, 2020 ; Bouzidi *et al.*, 2018 ; Trifi *et al.*, 2018). Bien que ces minéraux puissent fixer les éléments traces, leur stabilité dépend des conditions environnementales. Ainsi, une partie des ETM peut contaminer l'environnement.

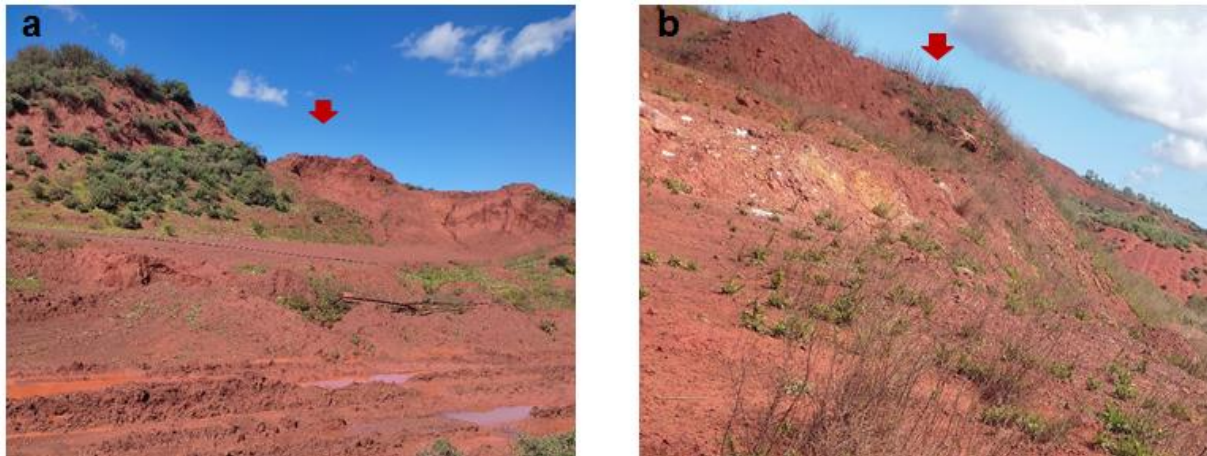


Figure I. 22. Stockage des terrils sur le site minier : **a)** la teneur en Fe varie entre 14 et 16 % ; et **b)** la teneur en Fe est inférieure à 11 % (AO©).

En outre, en raison du relief accidenté, d'un réseau hydrographique dense ainsi que de la présence de particules fines dans les sols miniers, les ETM peuvent se disperser dans les zones limitrophes. Ce sont des zones rurales cultivées par du blé, de l'orge et des cultures maraîchères. De plus, les agriculteurs de la région de Tamra profitent des diverses ressources végétales du site pour nourrir leur bétail. D'autre part, les agriculteurs dans la région du Cap Bon (nord-est de la Tunisie), utilisent également les résidus miniers de Tamra en tant qu'amendement aux sols sablonneux où sont cultivés les agrumes. Par conséquent, le risque de transfert des ETM dans la chaîne alimentaire est tout à fait envisageable.

Bien que le site minier de Tamra ait contribué aux revenus nationaux et offre une source d'emploi et de stabilité sociale dans la région de Nefza, il peut également engendrer des impacts environnementaux et sanitaires non négligeables.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Introduction au chapitre II

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats obtenus sur l'état de contamination du site minier de Tamra et sur l'évaluation des risques environnementaux associés.

Sur ce site, nous avons étudié quelques-unes des propriétés physico-chimiques du sol afin de diagnostiquer et d'examiner leurs caractéristiques pédologiques. Nous avons également réalisé une étude de la spéciation et de la biodisponibilité des éléments traces métalliques (ETM) étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) afin d'évaluer l'état de contamination du site. Ensuite, une étude minéralogique a été effectuée pour identifier les différentes phases porteuses de ces éléments traces. Finalement, afin d'évaluer l'état de santé des sols de notre site, différentes activités enzymatiques ont été mesurées.

Les résultats obtenus sont présentés selon deux méthodes d'évaluation : *i)* latérale (spatiale) qui consiste à étudier la distribution des ETM à différents endroits géographiques au sein du site minier de Tamra et *ii)* verticale qui consiste à étudier la distribution des ETM en fonction de la profondeur du sol afin d'évaluer la couche d'accumulation la plus profonde. Ce chapitre est subdivisé en trois parties :

- Comportement et mobilité des éléments traces métalliques dans les sols de Tamra et les risques environnementaux associés (les résultats sont présentés sous forme d'un article accepté dans *International Journal of Environmental Science and Technology*) ;
- Impacts des éléments traces métalliques sur la qualité du sol de la mine de Tamra : mesures de quelques activités enzymatiques de sols ;
- Distribution verticale des éléments traces métalliques dans le sol de Tamra.

Ainsi, trois hypothèses ont été soulevées :

- (1) La distribution latérale par les éléments traces métalliques dans les sols miniers de Tamra est concentrée dans les zones de faibles altitudes, augmentant les risques sanitaires de la communauté locale ;
- (2) La contamination polymétallique accrue sur le site minier de Tamra affecte la qualité du sol en réduisant ses activités enzymatiques ;
- (3) Les éléments traces métalliques dominants dans les sols miniers de Tamra migrent vers les couches plus profondes et posent des risques sur la qualité de l'eau souterraine et l'écosystème aquatique ;

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

1^{ère} partie : Comportement et mobilité des éléments traces métalliques dans les sols de Tamra et les risques environnementaux associés

Résumé de la publication

L'activité minière joue un rôle crucial dans l'économie mondiale, en fournissant les matières premières requises à nos activités quotidiennes. Cependant, elle engendre des impacts environnementaux et sanitaires sur les populations locales, en raison de la présence des éléments toxiques. Face à ces enjeux, une connaissance approfondie serait nécessaire pour mieux comprendre leur comportement et leur spéciation dans les sols. Cette approche primordiale permet d'anticiper leur impact sur les écosystèmes et la santé publique et, par conséquent, améliorer la gestion des sites contaminés.

Dans ce contexte, cet article porte sur l'évaluation de la distribution latérale, de la mobilité et des risques écologiques associés aux éléments traces (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans les sols du site minier de Tamra.

Pour atteindre les objectifs fixés, 9 échantillons ont été collectés, répartis sur trois parcelles distinctes du site (amont, milieu et aval). Le choix des emplacements a été guidé par la direction dominante des vents, la configuration topographique façonnée par l'érosion ainsi que les dynamiques hydrologiques et les activités minières actuellement présentes. Une série d'analyses physico-chimiques (pH, conductivité électrique, capacité d'échange cationique, teneur en matière organique, teneur en carbonates du sol, porosité, perméabilité et granulométrie) a été réalisée afin de caractériser les sols. Cette étape a été suivie par une étude minéralogique basée sur la diffraction des rayons X, complétée par des observations au microscope électronique à balayage, afin de déterminer la structure et la composition minéralogique des particules du sol et d'identifier les phases porteuses contenant les éléments étudiés. Par ailleurs, des analyses géochimiques ont été menées pour examiner la distribution et la spéciation des ETM sur le site de Tamra. Ces analyses fournissent les informations de base pour évaluer leurs risques écologiques. Ensuite, des corrélations de Pearson, ainsi que du triangle de corrélation (Pearson), ont été établies afin d'étudier les relations entre les propriétés physico-chimiques des sols, les concentrations pseudo-totales et les concentrations biodisponibles des éléments traces étudiés. L'objectif était d'identifier les facteurs qui contrôlent leur biodisponibilité.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Les résultats de la caractérisation physico-chimique du site ont mis en évidence une forte hétérogénéité du site, expliquant les variations dans la distribution et la spéciation des éléments traces étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As). L'analyse des concentrations pseudo-totales a révélé que la distribution des ET dans ce site suit l'ordre suivant : $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{As} > \text{Cd}$. Les analyses d'extraction séquentielle ont révélé que la majorité des éléments traces examinés étaient principalement associés aux fractions résiduelles et oxydables, ce qui suggère leur présence sous des formes géochimiques relativement stables. L'étude minéralogique a mis en évidence des variations marquantes dans la composition du sol selon les points d'échantillonnage, avec une dominance des oxydes de fer, suivis du quartz et de la calcite. La goethite et l'hématite ont été identifiées comme les principales phases porteuses des ET dans les sols étudiés. Enfin, la corrélation établie a révélé que le pH et la conductivité électrique sont les facteurs primordiaux qui influencent la spéciation des éléments traces étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans ce site.

Les évaluations du potentiel de pollution et du risque écologique ont montré une grave pollution liée aux éléments traces, particulièrement marquée dans les sols proches du site d'extraction du fer. Le recours à ces pratiques soulève de sérieuses questions quant à leur durabilité. L'ensemble des résultats obtenus souligne la nécessité urgente de mettre en œuvre des mesures d'assainissement afin de limiter les impacts environnementaux liés à l'activité de la mine de Tamra.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Article 1 (accepté dans *International Journal of Environmental Science and Technology*)

Assessment of Trace Element Soil Contamination and Environment Risks in Soils from Iron Mining areas

Oumaima Ayadi^a, Khawla Tlili^{b,*}, Sylvain Bourgerie^c and Zoubeir Bejaoui^d

Oumaima Ayadi: ^aUniversity of Carthage, Laboratory of Forest Ecology (LR11INRGREF03), National Institute of Research in Rural Engineering, Water and Forests (INRGREF), Hédi Elkarray Street, Elmenzah IV, BP 10, Ariana 2080, Tunisia, Faculty of Sciences of Bizerte, 7021, Jarzouna, Tunisia and University of Orleans, Laboratoire P2E INRAE USC1328, rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France; ORCID: 0009-0005-4994-4664. e-mail: ayadi.oumaima@fsb.ucar.tn

Khawla Tlili: ^bUniversity of Carthage, Faculty of Sciences of Bizerte, Jarzouna 7021, Tunisia and University of Tunis, Elmanar, LEBPAO, Faculty of Sciences of Tunisia, Tunisia; ORCID: /0000-0001-9583-1111. e-mail: khawla.tlili@fsb.ucar.tn

Sylvain Bourgerie: ^cUniversity of Orleans, Laboratoire P2E INRAE USC1328, rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France; ORCID: 0000-0002-4535-6719. e-mail: sylvain.bourgerie@univ-orleans.fr

Zoubeir Bejaoui: ^dUniversity of Carthage, Laboratory of Forest Ecology (LR11INRGREF03), National Institute of Research in Rural Engineering, Water and Forests (INRGREF), University of Carthage, Hédi Elkarray Street, Elmenzah IV, BP 10, Ariana 2080, Tunisia and Faculty of Sciences of Bizerte, 7021, Jarzouna, Tunisia; ORCID: 0000-0002-9515-1375. e-mail: zoubeir.bejaoui@fsb.ucar.tn

***Corresponding author:** Khawla Tlili, e-mail: khawla.tlili@fsb.ucar.tn

Abstract

This study investigates the speciation, ecological risks, and contamination levels of trace elements (TEs): iron (Fe), zinc (Zn), manganese (Mn), cadmium (Cd), lead (Pb), and arsenic (As) in soils surrounding iron mine in Tunisia, highlighting environmental impacts of mining legacies. It also identifies key factors governing TE mobility and bioavailability, to support remediation strategies. Nine soil samples from upstream, middle, and downstream sites were collected to assess contamination along the mine. Physical, chemical, and mineralogical analyses were conducted to identify the environmental drivers of TE migration. A sequential extraction assessed metal distribution, bioavailability, and ecological risks. The highest total concentrations were observed for Fe (260500 mg/kg), followed by Mn (39700 mg/kg), Zn (14 600 mg/kg), Pb (21000 mg/kg), As (1100 mg/kg), and Cd (10 mg/kg). Zn exceeded the industrial limit (300 mg/kg) and Pb surpassed FAO and Canadian guideline values, while As concentrations in Tamra soils exceeded recommended limits (FAO: 50 mg/kg; CCME: 12 mg/kg), indicating significant contamination risk.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Sequential extraction showed Zn, Mn, Pb, and Cd were mainly in residual and Fe-Mn oxide fractions, while Fe and As were mostly residual. Pearson correlation ($r > 0.60$, $p < 0.05$), supported by mineralogical data, highlighted that pH, electrical conductivity (EC), and iron oxide content influence TE mobility and bioavailability. Pollution indices revealed moderate contamination for Fe (CF 1-3) to severe for Zn, Mn, Pb, Cd, and As (CF > 6), especially near the mining site. These results emphasize the need for targeted management to mitigate contamination and protect human health in mining areas.

Keywords: Chemical speciation; mining soil; pollution indices; risk assessment; trace metals

Highlights:

- Tamra iron mine (Tunisia) has long-term environmental impact.
- Trace element analysis revealed the speciation and ecological risks of Fe, Zn, Mn, Cd, Pb, and As
- Pollutants distribution and influencing factors were determined.
- Pollution indices show severe soil degradation.
- Tamra mine need for risk mitigation measures.

1. Introduction

Soils are essential for food security by supplying nutrients and water and providing a stable medium for plant growth. Beyond this agronomic importance, soils also perform critical environmental functions (FAO 2015). They serve as a major reservoir and a key interface in biogeochemical cycling of TEs, thereby influencing their mobility, bioavailability, and potential environmental impacts (Wang et al. 2023). This regulatory function is significantly influenced by soil ecological stoichiometry, which governs the retention and export of nutrients and TEs from soils to aquatic systems, thereby controlling downstream water quality and the transfer of metals across the soil–water continuum (Liu et al. 2023). Consequently, understanding soil stoichiometry is crucial for assessing the environmental fate and risks associated with TE contamination.

In this study, the term “trace elements” refers to their geochemical abundance. However, when their environmental concentrations exceed natural background levels, posing risks to ecosystems or human health, these same elements are classified as potentially toxic elements (PTEs). In this context, soil contamination by TEs has garnered significant attention, as it

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

represents a major pathway for environmental and public health risks arising from ingestion, inhalation and dermal exposure (Mousavi et al. 2023; Biyazen and Taye 2024).

Mining activities, while economically important, often causes extensive environmental damage by releasing metals and metalloids into surrounding soils through tailings, acid mine drainage, runoff, and dust emissions (Chen et al. 2023; Munyai et al. 2021; Nieder and Benbi 2024). These pollutants are typically persistent, bio accumulative, and toxic, disrupting ecosystems and posing serious risks to human health, including cancers, respiratory disorders, and dermatological diseases (Mishra et al. 2024; Mumba et al. 2025; Górska et al. 2024; Bhat et al. 2024 ; He et al. 2025; Qu and Zheng 2024). Consequently, TEs have been designated as priority pollutants by the US Environmental Protection Agency (US-EPA) (Liang et al. 2016).

The transfer and mobility of TEs around mining sites are influenced by multiple factors, including meteorological conditions, soil properties, topography, and the geochemical characteristics of ores and host rocks (Zhang et al. 2024; Nassiri et al. 2023; Mertz et al. 2025). Chemical extraction techniques are widely used to investigate TE mobility, bioavailability and contamination risks (Chen et al. 2024; Adnan et al. 2024; Luo et al. 2025), but such comprehensive studies are limited in Tunisia.

In northern Tunisia, both abandoned and active mining sites pose significant environmental challenges. Previous studies on sites such as Jbel Ressas, Jebel Hallouf, and Lakhouat have documented substantial TE contamination and associated ecological risks, particularly from As, Cd, Pb, Zn, and Sb Nasraoui et al. 2022; Achour et al. 2022; Ayari et al. 2023). Globally, northern Tunisia faces significant challenges in managing mining-related soils pollution, due to abandoned sites and poorly maintained industrial mining infrastructure (Maalaoui et al. 2024). However, existing studies primarily focus on total metal concentrations or general risk assessments, without systematically addressing TE speciation, mobility, or spatial variability across landscapes. The Nefza mining district (northern Tunisia), rich in iron, lead and zinc deposits, which are essential for various industries (Maalaoui et al. 2024; Surour et al 2024) includes the Tamra iron mine, the last operational open-pit mine in Tunisia located within the complex Oued Belif structure (Decrée et al. 2013 ; Dekoninck et al. 2018). The region's geology, shaped by tectono-magmatic events, has resulted in various mineral deposits, making it a focal point for mining activities (Wiem et al. 2023; Abdallah et al. 2024).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Previous studies at the Tamra site have mainly investigated iron content, sedimentology, mineralogy, geochemistry, and mine tailings toxicity (Decrée et al. 2008, 2010, 2013; Trifi et al. 2018; Sai Kachout et al. 2024). However, these studies have mainly focused on total metal concentrations, while neglecting TE speciation, mobility, spatial distribution, and integrated ecological or human health risk assessments. As a result, a comprehensive assessment combining chemical analysis, pollution indices, and ecological risk evaluation to capture the long-term environmental impact has so far been lacking.

Addressing these gaps is critical for developing effective remediation strategies and for mitigating long-term risks to ecosystems and human health.

Despite the growing body of research on TE pollution in Tunisia, no previous study has provided a spatially explicit, chemically detailed assessment of TE speciation and mobility at the Tamra mine. This study therefore addresses both an important national knowledge gap and contributes valuable data for understanding TE behaviour in mining-impacted soils at a global scale. Accordingly, the objectives are to:

i) determine the key factors influencing the distribution of TEs in Tamra mine site soils; *ii)* characterize the speciation of the main pollutants in Tamra soil and assess their bioavailability; *iii)* evaluate the environmental risk associated with these metals and metalloid by calculating pollution and risk indices such as pollution load index (PLI), enrichment factor (EF), contamination factor (CF), geoaccumulation index (I_{geo}), risk assessment code (RAC), and environmental risk factor (ERF). These objectives aimed to provide actionable insights to support the effective management of TE pollution for the implementation of optimized environmental remediation approaches.

This study was conducted in 2024 at the Tamra mine, located in northwestern Tunisia.

2. Materials and methods

2.1. Study site description and sampling

The Tamra mine site is the last remaining active open pit iron ore mine, in Tunisia. It is located 130 km northwest of Tunis, approximately 11 km north of the village of Nefza (37° 03'12.8" N, 9°06'03.04" E), in the Nefza district. This district forms part of the nappe zone in northern Tunisia (Fig. 1a), which is characterized by thrust sheets (Rouvier et al. 1985). During the late Miocene to early Pliocene transition, Tamra iron ore results from a combination of pedogenetic

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

pre- concentration, followed by hydrothermal iron deposition in a basin superimposed on the Sidi Driss basin (Decrée et al. 2008; Rouvier et al. 1985). The area falls within the sub-humid to humid Mediterranean bio-climatic region (Jerbi et al. 2023). Thanks to its favorable climate, with average annual precipitation ranging from 293 to 1110 mm and temperature between 14 and 20°C (INM 2020), the region benefits from fertile soils that support diverse agricultural activities.

To better understand the distribution and the concentration of trace metals, and assess the environmental impact of mining activities, representative samples were collected from 3 plots at the site. The selection of these plots was based on key environmental and anthropogenic factors, including prevailing wind direction, slope gradients, the mountainous terrain shaped largely by erosion, surface water circulation and the intensity of mining exploitation. In addition, sampling locations were classified according to their altitudes to capture vertical variability, ensuring that the dataset adequately represents the spatial heterogeneity of the study area.

Three representative samples were taken by hand from the top soil (0-25 cm depth) at each plot covering three distinct zones: (1) an area upstream of the unmined mine at altitudes between 181 and 165 m (T₁, T₂, T₃), (2) an area in the middle directly influenced by mining activity at altitudes between 151 and 123 m (T₄, T₅, T₆) and (3) an area downstream close to agricultural activities and a drinking water source (Aine El Bell) at altitudes between 111 and 72 m (T₇, T₈, T₉) (Fig. 1b). For each sampling point, three samples (1 kg each) were collected, and then homogenized to obtain a representative composite sample. The soil samples were transferred to the laboratory where they were then air-dried, crushed and sieved to 2 mm before being analyzed.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

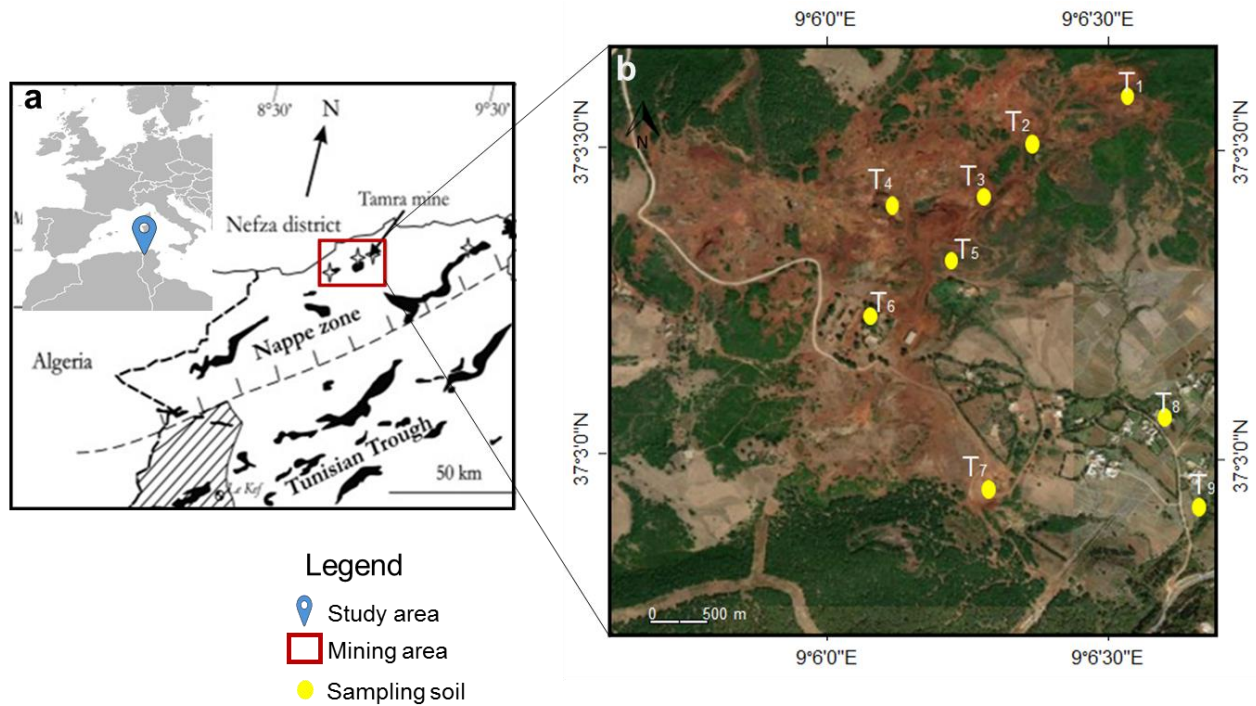


Fig.1. a) Location map of the Nefza district and Tamra mine in northern Tunisia (modified from Rouvier et al. 1985; Savelli 2002); b) Sample location map of the mine site produced using QGIS.

2.2. Physical and chemical analysis of mining soil

A series of basic physicochemical soil analyses was conducted to characterize the study site. The hydrogen potential (pH water) of the collected soil samples was measured using a WTW Multi 1970i multimeter (GEOTECH, Denver, Colorado) in a 1: 2.5 soil/ distilled water suspension after 1 h of agitation (Pansu and Gautheyrou 2006). EC ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$) was also determined using the same multimeter following the NF ISO11256 standard, using a soil/water ratio of 1:5. Soil carbonates content (CaCO_3 , %) was measured using the Bernard calcimeter method. The Organic matter (OM, %) was determined using the Walkley and Black (1934) method. The OM content was calculated according the following formula (1) (Walkley and Black 1934):

$$\% \text{ OM} = 1.724 \times \% \text{ carbon (1)}$$

Where: 1.724 = correction factor and % carbon: carbon content (%).

Soil particle size analysis was performed following the French standard XP-P94-041 (Association Française de Normalisation 1995), which involves separating particles larger than 80 μm using wet sieving. The cation exchange capacity (CEC, $\text{cmol}.\text{kg}^{-1}$) was according to the method outlined by Aran et al. (2008).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

2.3. Mineralogical composition

For mineralogical analysis, the soil samples were ground into a fine powder ($< 2 \mu\text{m}$). The mineral composition of the mining soil samples was determined using the Dabyscherrer X-ray (XRD) powder method. XRD patterns of all samples were recorded with DIFFRAC Plus XRD software using the following parameters: Cu K α radiation, Ni filter, 40 kV lamp voltage, 40 mA lamp current, stepwise recording: 0.02° per step, scan speed 1s per step, scan speed 10 per minute (da Silva et al. 2017; Medina et al. 2017). Total scan time was 40 minutes per sample. XRD diagrams of all samples were analyzed by X'Pert High Score plus software to identify mineral phases. Subsequently, a Philips XL 30 SFEG scanning electron microscope (SEM) (20x-800,000x) equipped with a Phoenix EDX, EDAX 32 detector, Edwards Vacuum pump Software and Cooling unit was used to examine the soil sample texture and characterize its mineralogical assemblages.

2. 4. Pseudo-total metals concentration

Pseudo-total concentrations of Fe, Zn, Mn, Pb, Cd and As were determined using aqua regia digestion following the method described by Zhang and Selim (2008). 0.2 g soil of dried and sieved soil ($< 2 \text{ mm}$) sample was mixed with 9 ml concentrated acids HNO_3 (65%) and HCl (37%) in a 1:2 v/v ratio. The digestion program involved of a gradual temperature increase (mineralizer) in microwave apparatus (GO Plus) with a temperature ramp to 180°C over 15 minutes, followed by 15 minutes at 180°C and a final 15 minutes cooling step. The mineralized samples were then diluted to a final volume of 50 mL with ultrapure water ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nitrocellulose membrane. TEs and metalloids concentrations were then determined by ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, USA) after machine calibration by certified standard solutions.

2. 5. Sequential extraction

The sequential extraction method was employed to analyze metal speciation in mining soils, using the method of Pérez-Cid et al. (1998). Analyses of the trace metal concentration studied in each extraction stage were carried out by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

2. 6. Pollution Quantification and Risk Assessment

2.6.1. The enrichment factor

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

The EF was calculated to assess the relative contributions of natural and anthropogenic inputs of trace metals to surface soils (Barbieri 2016). This factor was also used to indicate the degree of contamination. The reference material used in this study is average shale (Turekian and Wedepohl 1961). Iron was selected as the reference element for its natural presence in this mining area, which is most widely used for normalization (Pandey et al. 2016). EF was determined according to the formula (2) (Ergin et al. 1991)

$$EF = \left(\frac{[M]}{[Fe]} \right)_{\text{Sample}} / \left(\frac{[M]}{[Fe]} \right)_{\text{Ref}} \quad (2)$$

Where $[M]_{\text{sample}}$: trace metal concentration in the soil sample, $[Fe]_{\text{sample}}$: iron concentration in the soil sample, $[M]_{\text{Ref}}$: trace metal concentration in reference materials and $[Fe]_{\text{Ref}}$: trace metal concentration in reference materials.

2. 6. 2. The contamination factor

The CF represents the degree of soil contamination by trace metals. CF was calculated according to the formula (3) (Hakanson 1980):

$$CF = C_{TE} / C_{\text{Background}} \quad (3)$$

where C_{TE} : concentration of trace element in the soil sample, $C_{\text{background}}$ is the ratio of trace element concentration of the geochemical background.

2. 6. 3. Geoaccumulation Index

The Igeo quantifies the degree of soil contamination by TEs relative to the geochemical background. Igeo was calculated according to the formula (4) (Muller 1969):

$$I_{\text{geo}} = \log_2 (C_n / 1.5 \times B_n) \quad (4)$$

Where: $\log_2$ = logarithm of base 2, C_n is the concentrations of trace metals in the contaminated areas, B_n is the concentrations of trace metals in the background areas, 1.5 is a possible variation of TEs in background areas.

2. 6. 4. Pollution Load Index

The soil PLI for each metal or metalloid studied was measured using the geometric mean of the CF of those metals in the soil. PLI was calculated according to the formula (5) (Tomlinson et al. 1980):

$$PLI = (CF_1 \times CF_2 \times CF_3 \times \dots \times CF_n)^{1/n} \quad (5)$$

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Where n: the number of metals under study, CF: contamination factor.

2. 6. 5. Risk assessment code

The environment risk assessment of trace metals was based on the RAC method. This method was based on the chemical speciation of metals in the different chemical fractions of the soil. The strength of the association of metals with the different fractions reflects the reactivity of the soil and the resulting metal risk (Sundaray et al. 2011). RAC was determined according to the formula (6) (Perin et al. 1985):

$$RAC = F1/HM \cdot 100\% \quad (6)$$

where F_1 : concentration of heavy metal in exchangeable fraction ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), HM: total trace element concentration ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

2. 6. 6. Environmental Risk Factor

The ERF is based on the proportion of trace metals in the mobile fractions ((fraction exchangeable cations, F_1) + (the fraction bound to Fe-Mn oxyhydroxides, F_2)) in relation to their content in the stable fractions ((the fraction bound to OM and sulfides, F_3) + (the residual fraction, F_4)). ERF was determined according to the formula (7) (Tytła 2019):

$$ERF = (F_1+F_2)/(F_3+F_4) \quad (7)$$

2. 7. Data analysis

Data were presented as the mean value $\pm$ standard error (SE). All values obtained were analyzed by the one-way variance method (ANOVA). Statistical analyses were performed using Excel stat 2016 software (Microsoft Ice Standard). Letters indicate a significant difference between samples at a probability level of $p < 0.05$ according to the LSD test. Relationships between soil physicochemical properties, total concentration and the exchangeable fraction of trace metals were determined using Pearson correlation analysis, followed by the correlation triangle (Pearson).

All elemental concentrations were converted to mg/kg to ensure consistency with regulatory guidelines and to facilitate comparison with previously published studies.

3. Results and discussion

3.1. Physical and chemical soil properties

Mining activities in the study area have significantly altered the physico-chemical properties of

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

the soil in the study site (Table1). The pH values ranged from 5.3 to 7.5, and EC varied between 3.15 and 18.5 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. The highest pH and EC values were recorded at location T₇, downstream of the mine site, while the lowest were observed at location T₂, upstream of the mine. CEC ranged from 3.6 to 16.4 $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, and calcium carbonate (CaCO_3) content varied between 0.07% and 12.1%. The minimum CEC and CaCO_3 values were recorded at T₂ and T₅ (Table 1), respectively, while the maximum values were observed at T₃ and T₇. The lowest porosity (P) and permeability (K) were recorded in T₅ with values of 22% and 0.51 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ respectively (Table 1). In contrast, the highest values were observed in T₆ and T₈ reaching 36.5% and 1.5 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ respectively (Table 1). The OM content, and clay content, specific surface area showed significant variability, ranging from 2.6%, and 12.4%, in T₉ to 10.5%, and 76.9% in T₇, T₃ and T₅, respectively. However, the bioaccessibility of metals is influenced by the physical and chemical characteristics of the soil including grain size as highlighted by Wu et al. (2024).

Table 1. Physico-chemical properties of different soil samples of the Tamra mine: T₁, T₂, and T₃: upstream of the Tamra mine, T₄, T₅, and T₆: in the middle of the Tamra mine and T₇, T₈, T₉: downstream of the Tamra mine. Results are expressed as the mean value $\pm$ standard error (n = 3). Letters indicate a significant difference according to the LSD test (p < 0.001).

Parameter	pH (H ₂ O)	EC (μ S.cm ⁻¹)	CEC (cmol.kg ⁻¹)	P (%)	K (cm.h ⁻¹)	CaCO ₃ (%)	MO (%)	Particle size distribution (%)
T ₁	6.69 $\pm$ 0.08 c	9.94 $\pm$ 0.072 e	6.3 $\pm$ 0.18 bc	34.44 $\pm$ 0.18 b	1.3 $\pm$ 0.057 ab	0.82 $\pm$ 0.0 c	8.18 $\pm$ 0.023 c	Sand : 22.14 Silt : 23.79 Clay : 54
T ₂	5.31 $\pm$ 0.11 e	3.15 $\pm$ 0.14 g	3.6 $\pm$ 1.4 d	33.41 $\pm$ 1.50 b	0.98 $\pm$ 0.035 bc	1.18 $\pm$ 0.027 c	9.33 $\pm$ 0.017 b	Sand : 16.04 Silt : 12.55 Clay : 59.38
T ₃	6.6 $\pm$ 0.20 c	6.39 $\pm$ 0.13 f	16.4 $\pm$ 0.47 a	31.36 $\pm$ 0.2 c	0.87 $\pm$ 0.021 cd	0.77 $\pm$ 0.025 c	10.49 $\pm$ 0.38 a	Sand : 11.15 Silt : 14.63 Clay : 63.44
T ₄	7.42 $\pm$ 0.039 ab	15.5 $\pm$ 0.84 c	5.8 $\pm$ 0.73 bc	28.98 $\pm$ 0.06 d	0.51 $\pm$ 0.012 d	1.33 $\pm$ 0.12 c	8.16 $\pm$ 0.017 c	Sand : 8.68 Silt : 11.28 Clay : 54
T ₅	6.26 $\pm$ 0.048 d	17.08 $\pm$ 0.39 bc	6.8 $\pm$ 0.72 bc	22.16 $\pm$ 0.06 f	0.76 $\pm$ 0.020 cd	0.07 $\pm$ 0.003 d	5.79 $\pm$ 0.026 e	Sand : 15.54 Silt : 32.6 Clay : 61.81
T ₆	7.57 $\pm$ 0.06 a	17.41 $\pm$ 0.44 ab	7.2 $\pm$ 1.17 bc	36.52 $\pm$ 0.07 a	0.52 $\pm$ 0.046 a	3.5 $\pm$ 0.218 b	4.72 $\pm$ 0.023 g	Sand : 24.79 Silt : 36.06 Clay : 38.04
T ₇	7.42 $\pm$ 0.04 ab	18.58 $\pm$ 0.35 a	5.5 $\pm$ 0.16 c	32.9 $\pm$ 0.33 bc	1.23 $\pm$ 0.01 a	12.16 $\pm$ 0.60 a	5.14 $\pm$ 0.12 f	Sand : 6.43 Silt : 6.23 Clay : 76.53
T ₈	6.30 $\pm$ 0.04 d	15.23 $\pm$ 0.38 d	8.7 $\pm$ 0.06 b	25.2 $\pm$ 0.152 e	1.53 $\pm$ 0.018 abc	0.74 $\pm$ 0.04 cd	6.45 $\pm$ 0.076 d	Sand : 12.64 Silt : 8.45 Clay : 86.43
T ₉	7.20 $\pm$ 0.04 b	14.4 $\pm$ 0.38 d	14.5 $\pm$ 0.40 a	25.96 $\pm$ 0.55 f	1.42 $\pm$ 0.041 a	3.5 $\pm$ 0.21 b	2.63 $\pm$ 0.072 h	Sand : 62.64 Silt : 33.20 Clay : 12.40

Electrical Conductivity (EC, μ S.cm⁻¹), Cation exchange Capacity (CEC, cmol.kg⁻¹), Porosity (P, %), Permeability (K, cm.h⁻¹), Calcium carbonate (CaCO₃, %), Organic matter (OM, %)

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Granulometric analysis reveals variation in clay content among the samples, which play a crucial role in influencing the behavior and mobility of TEs in the soil. The samples studied have clay contents exceeding 50%, except for T₆ and T₉ which contain 38% and 12%, respectively (Table 1). The mobility of TEs depends not only on soil characterization but also on their mineralogical composition.

3.2. Mineralogical composition of soil sample

Similar to their chemical and physical properties, the samples from the studied sites exhibit variations in their mineral composition. The crystalline phases of the sample were determined by XRD (Table 2). Quartz was consistently present, and represented the most abundant mineral fraction in all the soil samples. However, calcite was observed in only four localities (T₁, T₃, T₅ and T₉). Additionally, clay minerals were identified in most of the samples, including kaolinite at T₁, T₂, and T₆, illite at T₅, and T₆ (in the middle) and smectite at T₅ and T₈. Hematite and goethite were the primary metalliferous minerals of this study site, with hematite being the most abundant, present in all samples except T₉. Goethite was detected at T₁, T₄, T₆, and T₇. The dominant minerals in soils upstream and downstream of the Tamra mine are quartz and hematite, while in the middle section the dominant minerals include quartz, hematite, and goethite (Table 2).

The SEM and EDS results of the analyzed samples allowed us to examine the association of minerals, providing a precise assessment of elemental concentrations within the mineral phases and enabling detailed calculations of their local chemical composition across a specific area (Fu et al. 2024). SEM-EDS results for sample T₁ reveal the presence of Fe oxides and silicates (quartz), which are among the most common minerals (Fig. 2a; Table 3). Other minerals, such as aluminosilicates, were also detected. Additionally, sample T₂ also showed the presence of iron oxide and quartz (Fig. 2b; Table 2), with minor minerals aluminosilicates (Al reached 10.02%). For T₃, the results indicate that iron oxides and quartz are the dominant minerals as shown in Fig. 2c; Table 3. The EDS also reveals Mn peaks (0.92-2.42%), which are likely associated with metal oxides, along with the presence of Ca, most probably in the form calcite. This finding is further supported by the XRD results (Table 2).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Table 2. Mineralogical composition of different soil samples (%): T₁, T₂, and T₃: upstream of the Tamra mine, T₄, T₅, and T₆: in the middle of the Tamra mine and T₇, T₈, T₉: downstream of the Tamra mine.

Study area	Upstream area			Middle area			Downstream area		
Minerals (%)	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉
Quartz	67.6	54.7	76.2	12.6	59.3	57	21.3	79	74.6
Calcite	11	-	3.6	-	3.6	-	-	-	25.4
Hematite	10.1	21.5	20	38.1	21.5	18.7	33.8	10.9	-
Goethite	8.5	-	-	49.2	-	7	44.8	-	-
Kaolinite	2.6	9.9	-	-	3.1	5.3	-	-	-
Illite	-	-	-	-	4	11.6	-	-	-
Smectite	-	13.7	-	-	8.3	-	-	10	-

Iron oxides were also detected in samples T₄ (Fig. 2d) and T₅ (Fig. 2e). In addition, the chemical composition of these samples includes elements such as Si, Al, Mn, Mg, K, and Ca (Table 3). These elements can combine to form minor phases, including silicates, aluminosilicates. Sample T₆ predominantly contains quartz and iron oxides, along with less common minerals such as aluminosilicates (clays), and feldspars, which also Mn with low concentration (Fig. 2f, Table 3). Similarly, iron oxides were observed in significant quantities in sample T₇ (Fig. 2g, Table 3), which also revealed traces of Zn (0.59%), Mn (0.68 - 0.77%), aluminosilicates and calcite. Quartz is the most abundant mineral in T₈, with secondary minerals including iron oxide (most likely hematite), Mn oxide, aluminosilicates, and carbonates also being recorded. The SEM image of sample T₉ (Fig. 2i) highlights that iron oxides, calcite, and quartz are predominant. Moreover, EDS analysis reveals low concentration of Mn (0.32%), confirming the presence of trace of manganese (Table 3).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

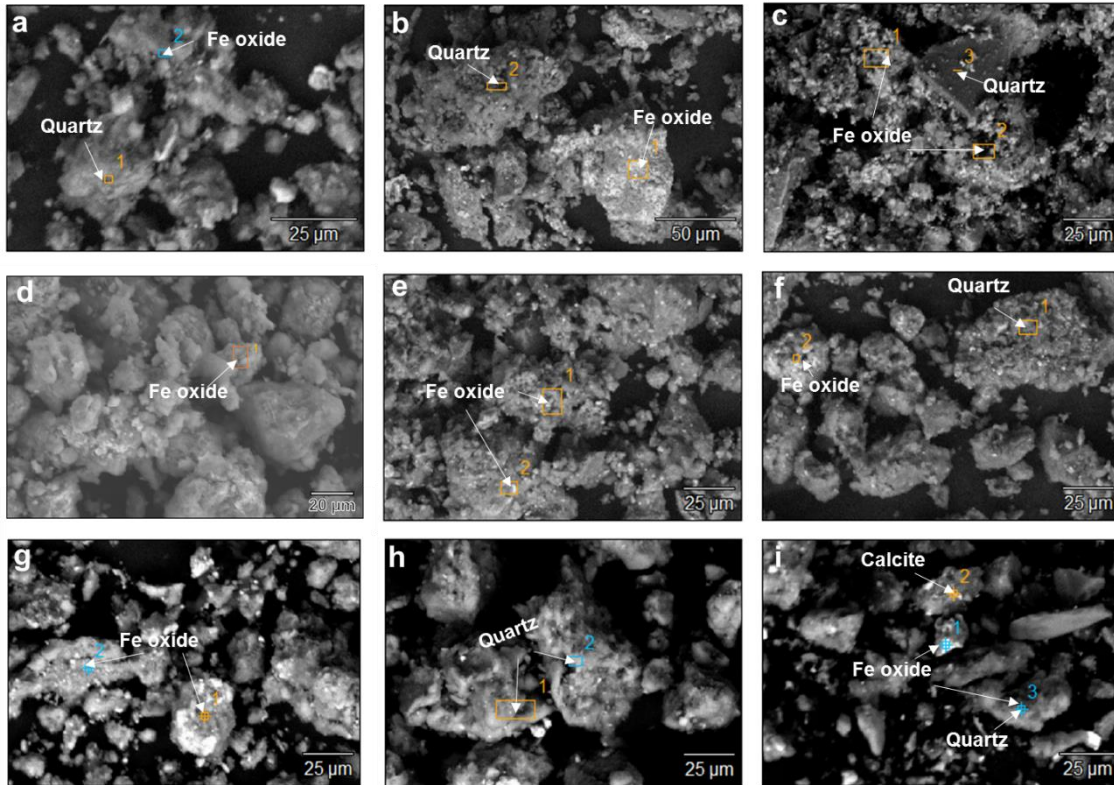


Fig 2. Back-scattered electron (BSE) images of soil samples: a) T₁, b) T₂, and c) T₃ upstream of the Tamra mine; d) T₄, e) T₅, and f) T₆ in the middle of the Tamra mine and g) T₇, h) T₈, and i) T₉: downstream of Tamra mine. Chemical composition of the selected representative mineral phases is shown in table 3.

In general, iron oxides (goethite and hematite) represent the most significant mineral phases in most of the soils studied, followed by quartz and calcite. The source of the elements detected by EDS in the fine fraction of soil samples can be linked to certain amorphous, weakly crystallized phases, or non-crystalline minerals that can be ignored by XRD (Fau et al. 2019; Schindler et al. 2024). The quantification of metals and metalloids in soil complements the information obtained from mineralogical analysis to investigate their bioavailability and potential toxicity.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Table 3. Representative EDS analyses (elements in weight, %) of different soil samples of the Tamra mine: T₁, T₂, and T₃: upstream of the Tamra mine, T₄, T₅, and T₆: in the middle of the Tamra mine and T₇, T₈, T₉: downstream of the Tamra mine.

Samples	T ₁		T ₂		T ₃			T ₄	T ₅		T ₆		T ₇		T ₈		T ₉		
Location	1	2	1	2	1	2	3		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	3
Fe	16.18	33.65	53.4	8.87	57.2	40.38	9.6	50.52	21.64	19.66	14.62	45.35	21.64	21.26	8.06	10.35	44.39	7.56	14.9
O	35.08	37.41	37.41	48.46	30.15	37.25	53.33	34.12	42.29	46.65	45.14	40.45	49.5	30.52	54.84	48.61	33.45	49.63	49.56
Mn	< dl	< dl	< dl	< dl	2.42	2	0.92	2.21	1.16	2.85	0.67	< dl	0.77	0.68	0.33	0.47	< dl	< dl	0.32
Zn	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	0.59	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl
Al	12.35	7.77	3.29	10.02	2.78	4.38	0.76	5.23	12.8	12.99	10.96	6.06	7.29	6.27	11.39	11.02	1.83	5.42	6.2
Si	30.56	13.44	4.92	24.52	5.59	13.47	35.38	6.97	18.4	16.9	25.29	6.66	10.24	12.26	18.27	20.54	3.68	13.17	13.33
C	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	7.79	21.53	4.36	5.87	11.26	17.7	12.94
Na	< dl	< dl	< dl	0.43	0.57	0.49	< dl	< dl	0.4	0.47	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	0.26	< dl	0.44	< dl
Mg	0.62	0.61	0.29	0.24	0.18	0.36	< dl	0.6	0.79	0.72	0.34	0.62	0.53	0.3	0.55	0.58	4.42	0.72	0.66
K	2.5	1.11	0.24	7.16	0.29	0.9	< dl	0.35	1.74	2.31	1.66	0.33	0.64	1.94	1.27	1.47	0.14	0.57	0.7
Ca	1.78	5.33	< dl	< dl	0.63	0.26	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	0.48	1.09	0.32	0.36	0.45	2.62	0.97
Ti	0.94	0.68	0.45	0.29	< dl	0.34	< dl	< dl	0.78	0.46	1.31	< dl	0.29	< dl	0.61	0.47	0.12	0.81	0.14
Mo	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	0.99	< dl	0.54	< dl	< dl	< dl	< dl	0.26	1.08	< dl
Cl	< dl	< dl	< dl	< dl	0.19	0.17	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl
P	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	< dl	0.24	0.14	< dl	< dl	< dl	0.28	0.29

< dl: below detection limit.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

3.3. Total concentration and speciation of trace elements

In all samples studied, total TE concentrations were observed in the following order:

Fe > Mn > Zn > Pb > As > Cd. The concentrations of each TE varied considerably, with ranges of 40143.00 to 260465.29 mg/kg (Fe), 1543.04 to 39704.91 mg/kg (Mn), 476.22 to 14637.19 mg/kg (Zn), 542.66 to 21020.99 mg/kg (Pb), 210.73 to 1141.54 mg/kg (As), 2.38 to 10.01 mg/kg (Cd) (Fig. 3). The Food and Agriculture Organization (FAO) and the Canadian soil quality guidelines have set maximum limits for various TEs in soils, except for Fe and Mn, which are considered major soil constituents rather than regulated contaminants. The results showed that all samples exceeded the limits of industrial soil of Zn (300 mg/kg) recommended by CCME (2018), but only T8, T7, T5, T4, and T3 exhibited elevated Zn concentration, exceeding the limit values accorded by FAO (1500 mg/kg) (Fig. 3b). Pb concentrations exceeded the limit recommended by the Canadian soil quality guidelines and the FAO at all samples (Fig. 3d), with the exception of T2 (< 600 mg/kg) (CCME 2025; FAO 2004). Additionally, Cd concentrations in all samples were below the permissible limit (20 mg/kg) (CCME 1999; FAO 2004), but exceeded the 1 mg/kg risk assessment threshold (Ballabio et al. 2023). Finally, the total concentration of As in Tamra soils largely exceeded the reference values recommended by FAO (2004) (50 mg/kg) and CCME (1997) (12 mg/kg) (Fig. 3f). The highest concentrations of Fe, Mn, Zn, and Pb were observed in sample T₇ (downstream of the Tamra mine) (Fig. 3), whereas Cd and As reached their peak concentration in sample T₃ (upstream of the Tamra mine).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

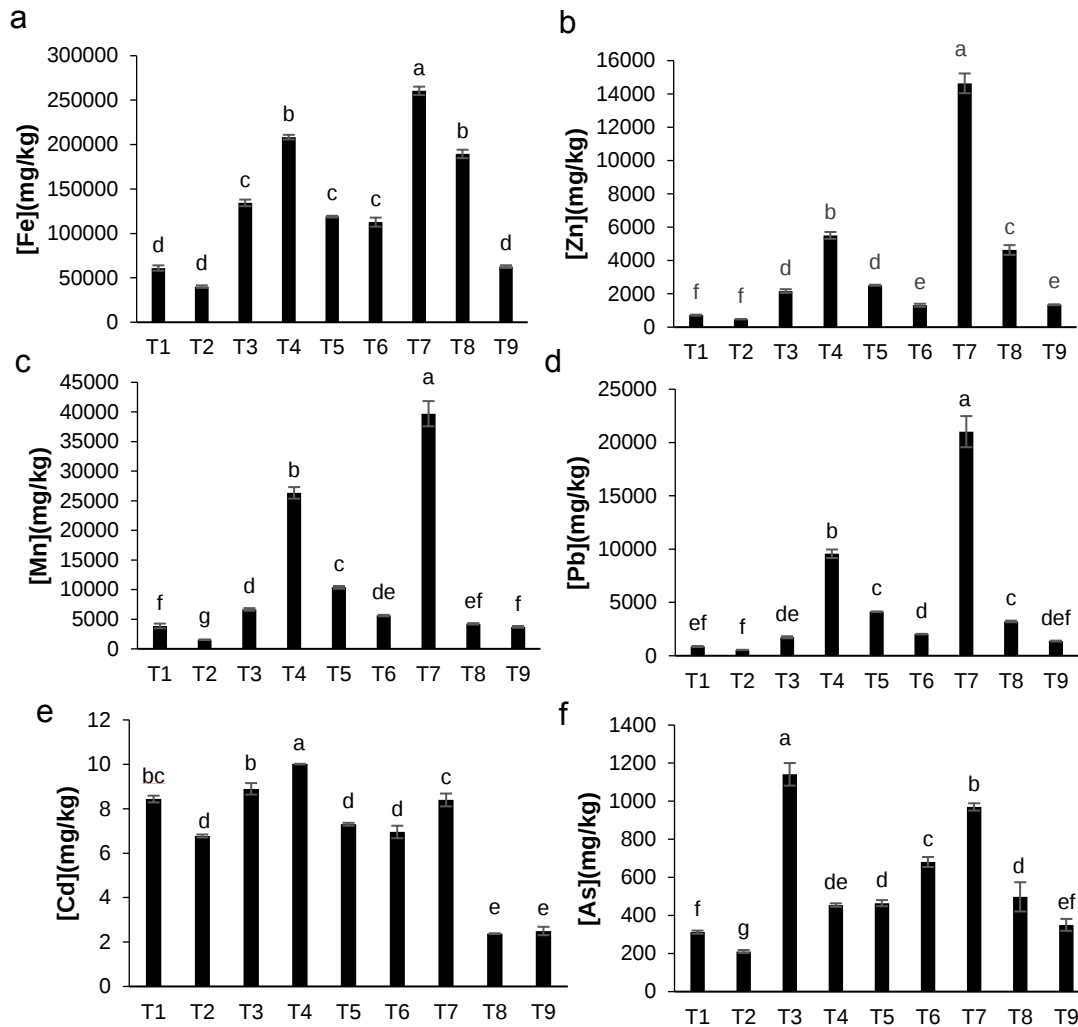


Fig 3. Spatial evolution of pseudo-total metals concentration (mg/kg dry weight) of different soil samples T1, T2, and T3: upstream of the Tamra mine, T4, T5, and T6: in the middle of the Tamra mine and T7, T8, T9: downstream of the Tamra mine.: a) Iron (Fe), b) Zinc (Zn), c) Manganese (Mn), d) Lead (Pb), e) Cadmium (Cd) and f) Arsenic (As), Results are expressed as the mean value $\pm$ standard error ($n = 3$). Letters indicate significant difference at $p < 0.05$ according to LSD test.

Actually, the total concentration of these elements in the soil alone is insufficient to fully assess the impact of soil pollution by TEs, as their mobility and toxicity depend on their chemical speciation. For this reason the concentrations of the free TEs fraction were specifically determined in this study. In the study area, Fe was predominantly distributed in the residual fraction (98% - 99%) across all samples (Fig. 4a) indicating its low mobility and relatively low risk for the environment at the mine site. Similarly, Zn was also primarily found in the residual fractions of the soils studied (62% - 96%) (Fig. 4b). However, a notable portion of Zn in the exchangeable fraction was observed upstream of the mine in T2 (16%), indicating a highly

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

labile and readily bioavailable metal fraction. The presence of Zn in the exchangeable fraction (F1) is of immediate environmental concern, as this labile fraction represents the most mobile and bioavailable form of metals in soil. Elevated Zn concentrations in this fraction at our study sites indicate a high potential for root uptakes, thereby posing an increased risk of phytotoxicity to local vegetation and potential disruption of local ecosystem functions (Rodríguez et al. 2009). Downstream, sample T₉ also exhibited high Zn mobility at 4%, which is significantly higher than the values recorded in the middle, ranging between 0.15% and 0.6%. For Pb, the residual fraction dominated (34%– 77%), followed by the oxidizable fraction (8%–75%), reducible fraction (4%– 52%), and exchangeable fraction (0.1%– 31%) (Fig. 4d). The highest exchangeable fraction of Pb was found upstream at T₂. These speciation patterns align with Rodríguez et al. (2009), who found Zn and Pb mainly in the residual fraction but noted higher exchangeable proportions near tailings, reflecting localized metal mobility. Similarly, elevated exchangeable Zn and Pb at T₂ indicate enhanced bioavailability and increased potential ecological risk, confirming that residual fractions dominate overall, while exchangeable fractions near contamination sources remain environmentally relevant.

The chemical fractions of Mn in samples exhibited notable variability (Fig 4.c). The residual fraction accounted for 17% - 53 %, oxidizable fraction for 8% - 75%, Fe-Mn oxide fraction for 4% - 52%, and humic acid- and carbonate-bound fractions for 0.3% - 21%. The largest portions of Mn were observed upstream at T₂, while proportions in the middle samples were very low below 1%. Downstream at T₉, the exchangeable fraction of Mn increased. The speciation of Cd revealed distinct patterns (Fig. 4e). The dominant fraction in upstream soils (T₂ and T₁) was the ion-exchange fraction, accounting for 71% and 29%, respectively, but this fraction was absent in the middle and downstream samples. Our results indicate higher Mn lability and a stronger association with organic matter compared to Liu et al. (2016), who reported Mn to be predominantly bound to Fe-Mn oxides with low mobility. Notably, we observed a significant downstream peak in the exchangeable Mn fraction, a feature not reported in their work, indicating site-specific conditions favoring Mn remobilization in the present study. The fraction of Cd bound to Fe-Mn oxyhydroxides was detected only in T₂. This association is environmentally significant because metals bound to the Fe–Mn oxide fraction (F2), although relatively stable under oxic conditions, may represent a latent environmental risk. Under reducing conditions, the reductive dissolution of Fe and Mn oxyhydroxides can release

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

sequestered Cd into porewater, thereby increasing its mobility, bioavailability, and potential environmental impact (Tessier et al. 1978). The oxidizable Cd fraction ranged from 10% to 36%, while the residual fraction was notably high, ranging from 63% to 79%. Our finding that Cd is primarily associated with exchangeable and carbonate-bound fractions in the most contaminated areas aligns with Liu et al. (2016), who reported a predominance of acid-soluble Cd in upstream soils near a Pb-Zn mine in Guizhou, China. They also observed a downstream increase of Cd association with Fe-Mn oxides, a geochemical phase susceptible to remobilization under reducing conditions. Particularly, in samples T₈ and T₉, no Cd was present in any fraction. Overall, these results highlight two distinct pathways for metal bioavailability: (i) an immediate risk associated with the labile, exchangeable fraction (as exemplified by Zn in T2) and (ii) a conditional or latent risk associated with the redox-sensitive oxide-bound fraction (as exemplified by Cd in T2).

As displayed significant concentrations in bioavailable fractions (F1+F2+F3+F4), which accounted for 57% - 100% of the total concentration (Fig. 4f). This indicates that the primary anthropogenic source of As is mining activities in the area. The residual fraction (76%–97%) was dominant, followed by the exchangeable fraction (2%– 19%), suggesting moderate As bioavailability at these locations. These findings align with Nassiri et al. (2023) who reported that As in soils around the Zeïda mine in Morocco, was also predominantly residual, with labile fractions (exchangeable and reducible fractions) elevated near contamination hotspots. Both studies demonstrate that while As is largely stabilized in the residual phase, localized anthropogenic inputs can markedly enhance its potentially mobile and bioavailable fractions, raising significant ecological concerns.

Beyond documenting contamination, modern remediation strategies increasingly emphasize leveraging natural processes, where trace element speciation critically governs their mobility, plant uptake, and potential for phytomanagement intervention such as phytostabilization or phytoextraction. For instance, recent investigations in Mediterranean mining soils, such as at the Campo Pisano abandoned mine, have shown that native vegetation can adapt through specific metal sequestration mechanisms modulating soil-root interactions, and offering a viable foundation for ecological rehabilitation (Kharazian, 2023). However, the synergistic potential of integrating soil amendments like biochar with selected native species to manage multi-metal contamination typical of active iron mines remains underexplored. This study

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

(Ayadi et al. 2025) aims to fill this gap by evaluating an integrated phytomanagement system combining Eucalyptus-derived biochar and *Casuarina glauca* at the Tamra iron mine.

To analyse the relationship between TE speciation in various samples and the physicochemical parameters of the medium, the Pearson correlation triangle is indispensable.

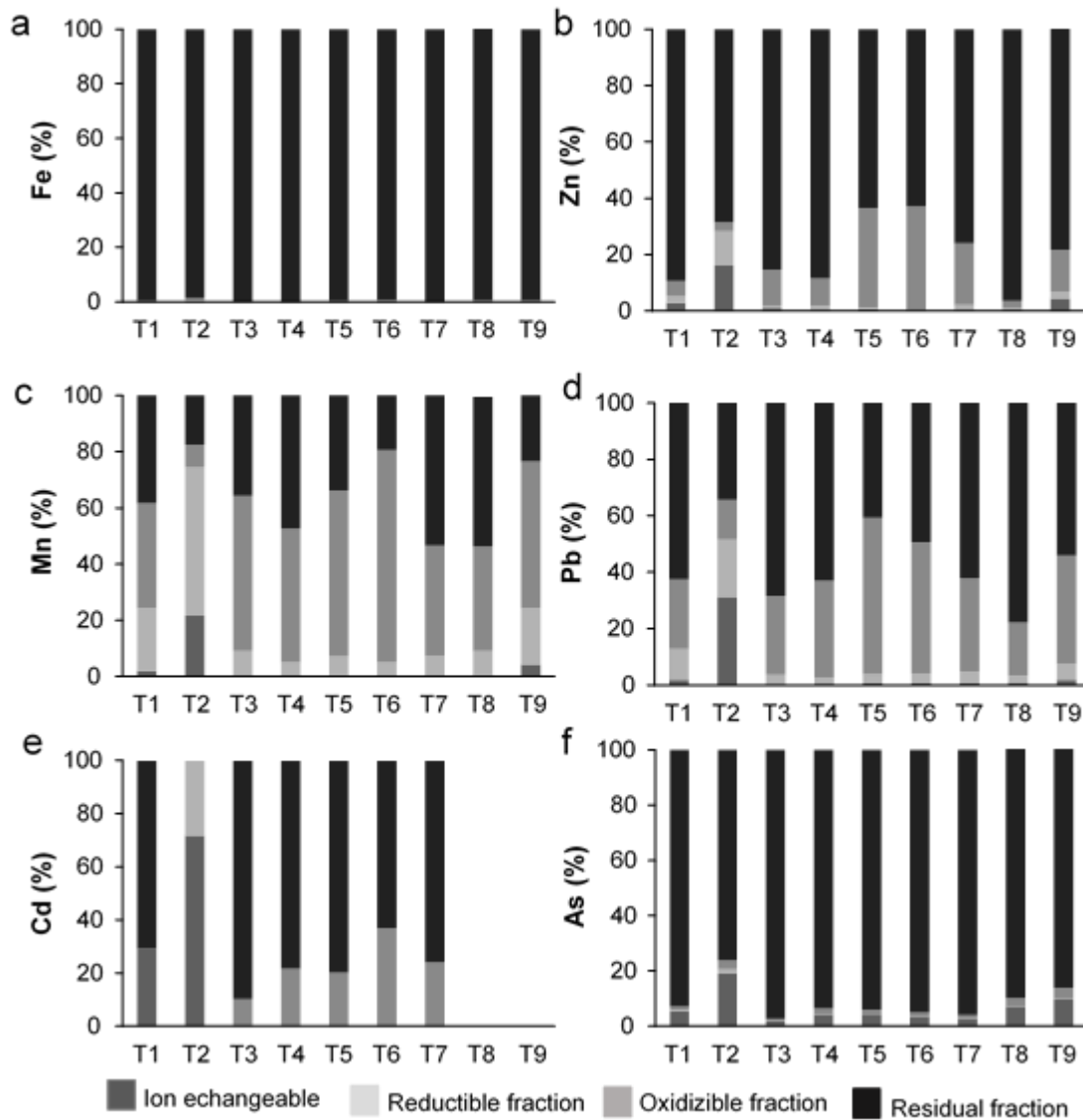


Fig 4. Percentage of elements extracted from soil samples following the Community Bureau of Reference (BCR) procedure: T1, T2, and T3: upstream of the Tamra mine, T4, T5, and T6: in the middle of the Tamra mine and T7, T8, T9: downstream of the Tamra mine: a) Iron (Fe, %), b) Zinc (Zn, %), c) Manganese (Mn, %), d) Lead (Pb, %), e) Cadmium (Cd, %) and f) Arsenic (As, %).

The Pearson correlation triangle (Fig. 5) revealed a strong negative correlation between soil pH, EC and the exchangeable fraction of the elements studied, highlighting a pronounced

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

inverse relationship. This correlation test revealed that soil pH and EC were the most significant factors influencing the speciation of the elements examined in this study.

Additionally, strong positive correlations (> 0.8) were observed between the total concentrations of Fe, Mn, Zn, Pb, Cd, and As and their respective exchangeable fraction. Fe showed a particularly strong correlation (> 0.8) with Zn, Mn, and Pb, suggesting a linear relationship between these metals and emphasizing the central role of Fe in influencing metal mobility. These correlations provide a better understanding of the factors influencing the availability of metals and metalloids. Based on these data, estimating the transfer potential of TEs and their impact on ecosystems will be necessary.

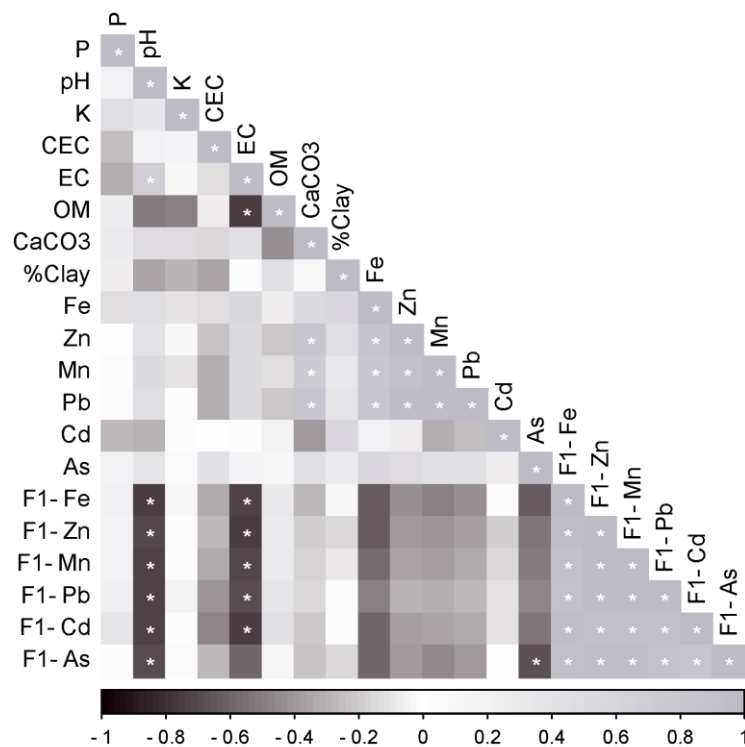


Fig 5. Pearson correlation coefficients between physico-chemical properties of the soils and metals concentrations: Black area indicate a strong negative correlation (close to -1); grey area represent a strong positive correlation (close to 1); and white area show no significant correlation; *: $p < 0.05$:Electrical Conductivity (EC, $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$), Cation exchange Capacity (CEC, $\text{cmol}.\text{kg}^{-1}$), Calcium carbonate (CaCO_3 , %), Organic matter (OM, %), Porosity (P, %), Permeability (K, $\text{cm}.\text{h}^{-1}$), Iron (Fe), Zinc (Zn), Manganese (Mn), Lead (Pb), Cadmium (Cd) and Arsenic (As), F1: ion exchangeable.

3.4. Relationships between soil physico-chemical properties, mineralogical composition and TE speciation in soil.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

The speciation observed for each metal studied varies across different sampling points. This variation could be attributed to the dominant physico-chemical properties of the soil along with its mineralogical composition. Among these properties, pH value is a key factor controlling the bioavailability and mobility of TEs. In this study, pH values in the various sampling points at the Tamra mine site (upstream, downstream, and middle) ranged from slightly acidic to slightly alkaline (5.3 - 7.6, Table 1). Previous studies on the same Tamra site have identified the presence of pyrite within Fe (Mn) deposits (Decrée et al. 2008, 2010; Dekoninck et al. 2018). Pyrite oxidation is known to contribute to a decrease in soil pH (Liu et al. 2025) which may account for the observed pH variation in the Tamra samples. In addition, the organic acid produced during the degradation of soil OM can lower its pH by dissociation of H^+ ions (Zhang et al. 2024), which aligns with the observed inverse relationship between pH and OM content (Fig. 5).

In acidic conditions, ionic competition between H^+ ions and heavy ions at soil adsorption sites results in H^+ binding, which prevents or reduces metal adsorption at the same site (Shi et al. 2024; Li et al. 2021). In this context, Cadmium fractionation in samples T1 and T2 revealed that around 30% and 71% respectively of cadmium were associated with the exchangeable fraction (Fig. 4e). This indicates that Cd is strongly bound to the mobilizable phases of T1 and T2 soils. Similarly, for Zn (Fig. 4b), Mn (Fig. 4c), and Pb (Fig. 4d), the highest portions of their exchangeable fractions were noted in samples T1 and T2. Under acidic conditions, Zn, Mn, Pb, and Cd exist as cations (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} , respectively) under acidic conditions, increasing their mobility (Shi et al. 2024; Sintorini et al. 2021). In contrast to As, which can form anionic complexes, it is not sensitive to pH variations (Fig. 4f) (Li et al. 2021). The increase in pH in the other samples in the middle and downstream samples may be attributed to the higher $CaCO_3$ content in those soils, which varies between 0.07 and 12% (Table 2). $CaCO_3$ can act as an alkaline buffer in the soil. In the presence of water, it can dissociate and release OH^- (Ng et al. 2024). In addition, in acid conditions, where the soil is rich in H^+ ions, $CaCO_3$ can react with these protons, reducing their concentration and increasing the soil's pH (Barrow and Hartemink, 2023). Carbonate-rich conditions may promote the precipitation of Zn, Mn, Pb, and Cd as insoluble carbonate ($ZnCO_3$, $MnCO_3$, $PbCO_3$, and $CdCO_3$) (Dong et al. 2024). EC values ranged from 3 to 18 $\mu S/cm$ across the different soils (Table 1), indicating a low concentration of salts and other dissolved ions in the soil, such as Na^+ , Ca^{2+} , K^+ and Mg^{2+} .

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

(Table 3). The strong negative correlation between EC and the exchangeable fraction of Fe, Mn, Zn, Pb, Cd, and As (Fig. 5) suggests that as the concentration of dissolved ions increases, the exchangeable fraction of these elements decreases. This trend may be attributed to metal adsorption onto soil particles and the formation of complexes with ions in the soil (Tian et al. 2024). The soil's relatively low CEC (3.6 to 16.4 cmol.kg⁻¹, Table 1) may be mainly attributed to its mineralogical composition. Bouzidi et al. (2022) showed that the Tamra iron mine was characterized by a mineralogy composed of 54% quartz, 29% iron oxide, and 17% clay as this work has also underlined. Indeed, the presence of iron oxides in soils from this mining site, have a relatively low CEC (Xie et al. 2024). Furthermore, the dominance of quartz in the samples may also influence CEC, as it has virtually no cation exchange sites (Räty et al. 2021). The low OM content recorded in the soils studied (Table 1) is mainly due to mining activity. This also suggests that, the soil's capacity to retain and exchange cations will be limited, resulting in low soil CEC. While, P, and K are crucial factors influencing water retention and ion diffusion in soils (Lu et al., 2021). In this study their direct impact on the exchangeable fraction of TEs may be less pronounced (Fig. 5). This is likely due to the overriding influence of soil chemistry, in particular pH and EC, which play a more decisive role in the mobilization of TEs (Páez-Bimos et al. 2023). Soil texture varies across sampling points (Table 1). The operational nature of the mine means that heavy machinery continuously applies substantial pressure to the soil, leading to its compaction. This compaction manifests as reduced porosity, increased bulk density and altered particle-size distribution key factors that define and modify soil texture (da Silva Barboza et al. 2021). Such textural changes, particularly in fine coarse soil mixtures, exert a strong control on soil water retention and permeability, thereby affecting soil hydraulic behavior (Su et al. 2021). This variation can also be attributed to the geological characteristics of the deposit. The site's bedrock, predominantly composed of iron oxide-rich formations, can give variable soil textures depending on the extent of weathering (Abdallah et al. 2024; Salhi et al. 2023). Indeed, several conditions can influence the dominance of iron oxides (hematite or goethite). Open-pit mining favors the presence of oxygen during iron precipitation and, consequently, the formation of goethite and hematite. Under more oxidizing conditions, secondary alteration of pyrite or hematite generates goethite. Additionally, this site is characterized by a semi-arid Mediterranean climate. Hence, the alteration of minerals such as pyrite and hematite during wet periods generates goethite. In contrast, iron oxidation is

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

combined with heat during dry periods, resulting in the formation of hematite (Decrée et al. 2008). The Pearson correlation analysis (Fig. 5) between exchangeable fraction and soil clay content revealed no linear relationship between them. Indeed, areas heavily contaminated with TEs even those containing clays (Fig. 2; Table 2), their role may be less important in metal and metalloid retention due to the presence of other dominant minerals (Nieder and Benbi 2024). The results of the sequential extraction of metals (Fig. 4) enable us to understand the results of XRD (table 2) and EDS (Table 3 and fig. 2). The elements studied are mainly found in the oxidizable and residual fractions (Fig. 4). Comparable results were observed at the abandoned Pb-Zn mine of Fedj Lahdoum (northern Tunisia), where sequential fractionation showed that TEs are dominantly associated with residual fractions, indicating a strong binding to mineral matrices (Sebei et al. 2020). The high proportion in the oxidizable fraction (Fig. 4c), suggests that Mn may be present in complex form with iron and manganese oxides.

EDS analysis reveals a low Mn concentration in most samples (Table 3), indicating that Mn is highly dispersed within Fe-oxide phases (hematite and goethite), which have reactive surface structures capable to trapping Mn ions (Hu et al. 2022). These Fe-Mn oxide phases, including nodules and concretions, are known to exhibit ultra-selective enrichment for TEs in diverse environmental settings (Ren et al. 2024), which may explain the strong association and limited mobility of certain TEs in the soils. Additionally, the presence of quartz in the samples (Table 2) may provide for Fe-oxide adsorption; further enhancing Mn retention (Zheng et al. 2024). Iron oxides are therefore amorphous minerals, which explain their presence in local structural but not as a dominant phase in the XRD (Pandey et al. 2023). For T7 and T8, Mn is primarily found in the residual fraction. Consequently, it is highly trapped in silicate minerals or stable oxides. The variation in oxidizable and residual fractions of Pb (Fig. 4d) can also be influenced by chemical characteristics of soil at each sampling point, particularly pH (Cui et al. 2024). The high concentrations of Fe, Zn, Cd (except T2) and As in the residual fraction (Fig. 4a; Fig. 4b; Fig. 4e; Fig. 4f, respectively) suggest that these elements exist in solid form. Hematite and goethite were the main iron minerals identified in this Tamra site by several other studies (Bouzidi et al. 2022; Dekoninck et al. 2018; Decrée et al. 2010). Metals highly associated with crystalline iron oxides, like hematite and goethite, can resist the extracting agents of previous sequential extraction stages and only be released in the residual fraction, indicating a close complex with the mineral structure. This may justify the presence of iron oxides in the majority

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

of samples (Fig. 2). The persistence of metals and metalloids in soils reflects the combined influence of mineralogical stability and environmental variability. Quartz enrichment of the soil can enhance the stability of the residual fraction by providing a physical matrix that limits the mobility of metals and metalloids (Zhou et al. 2024). This stabilizing effect, however, mainly concerns the residual fraction, whereas elements bound to more labile phases remain sensitive to seasonal hydrological changes. Variations in soil moisture and redox conditions, such as the reductive dissolution of Fe–Mn hydroxides during wet periods and their re-precipitation under oxic conditions in drier seasons, are well recognized as key mechanisms governing TE release and sequestration, operating independently of the chemically inert quartz framework (Borch et al. 2010). The presence of clay minerals (kaolinite, illite, and smectite) (Table 2) can retain TEs, but their effectiveness depends on the type of metal (Yang et al. 2024). The interaction between iron oxides and clay minerals can enhance TEs immobilization (Fan et al. 2023). However, for Zn, Mn and Pb in T5 and T6, their residual fractions were lower compared to other samples. When iron oxides present are unstable or poorly crystallized, the metals may be adsorbed or precipitated on the iron oxides, increasing their proportion in the oxidizable fraction (Li et al. 2019). Overall, the study highlights the critical role of soil chemistry, particularly pH and EC, in controlling the speciation, mobility, and retention of TEs. The findings underscore the influence of mineralogical composition and carbonate content on TE behavior, while also pointing to the limited role of clay content and porosity in this specific context. The dominant carrier phases of the elements studied in Tamra mining soils is iron oxides (goethite and hematite). Owing to their high specific surface area and reactive hydroxyl groups, these minerals play a key role in metal sorption through surface complexation and co-precipitation processes, while changes in redox conditions or pH may promote metal desorption and remobilization (Yu et al. 2023). These insights have important implications for understanding metal dynamics in mining-impacted soils and can inform future remediation efforts.

3.5. Pollution Quantification and Risk Assessment

The mobility and bioavailability of metals and metalloids are strongly dependent on their active forms, and their different states of existence significantly influence environmental effects. The EF values for the elements studied differed across the samples from the various iron mine site (Fig. 6a). Mean EF values for the studied elements were highest for Pb at this site, followed by As, Zn, Mn, and Cd. According to Sutherland (2000), the highest EF for Mn were recorded in

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

T₄ and T₇ (between 5 and 20), indicating high enrichment. The other samples were showed moderate enrichment levels ($2 \leq EF < 5$). For Zn, the highest EF was recorded at T₅ middle of the mine, with a value of = 29. These were, followed by T₇, T₄, T₆. Cd varies from no enrichment (T₈ and T₉) to moderate enrichment (T₃ and T₅) to high enrichment (T₂, T₃, T₄, T₆ and T₇). EF values for Pb ranged from 45 to 241, indicating extreme enrichment of this element in all samples. Similarly, As enrichment values were greater than 40 in all samples ranging from 74 to 291. Overall, higher enrichment values for the elements studied close to the iron extraction zone indicate soil pollution caused by mining activities. Figure 6.b illustrates the CF for the elements analyzed at this study site. According to Hakanson's (1980) classification, Cd exhibited very high contaminated levels in all samples except T₈ and T₉, while Fe showed high contamination specifically in sample T₇. Most samples of the mine were highly contaminated with Mn (CF between 7 and 20), except T₁, T₈, and T₉ with considerable contamination and T₂ with low contamination. This site was also heavily contaminated with Pb (CF between 47 and 1582) in most samples except T₈, which was considerably contaminated. Additionally, all samples were heavily contaminated with Zn and As. The average concentration of elements across the samples followed the order: As < Pb < Zn < Cd < Mn < Fe. The geo-accumulation index (I_{geo}) values for the examined elements indicated the following sequence of contamination intensity: As (7.6) > Pb (6.8) > Zn (4.8) > Cd (2.8) > Mn (2.6) > Fe (0.7). The highest I_{geo} values for Cd, Fe, Mn, Zn and As were primarily found in sample T₇, while the highest Pb values were observed in the middle of the mine (T₄ > T₅ > T₆) (Fig. 6c). Overall, the middle section of the mine (T₄, T₅, and T₆) was extremely polluted with Pb, Zn, and As. The PLI values for most samples were very high, indicating severe pollution in the following order: T₇ > T₄ > T₃ > T₅ > T₆ > T₂ > T₁. No pollution was detected in the the downstream samples T₈ and T₉ (Fig. 6d). The environmental risk of the TEs studied (Fe, Mn, Zn, Pb, Cd, and As) in Tamra mining soils was assessed using the RAC method (Fig. 6e). The RAC values varied depending on the element and the sample location. The average RAC values for studied elements followed this order: Cd > As > Pb > Mn > Zn > Fe. According to Perin et al. (1985) and Jain's (2004) classification, Cd was highly mobile at T₂, presenting a very high risk (71.7%), followed by a medium risk at T₁ (29.1%). No risk was observed for Fe. Mn, Pb and Zn showed average risk of 21.7%, 31.4% and 25.5%, respectively at T₂, while for the other samples, the risk ranged from low to absent. Similarly, for As, the RAC assessment indicates a

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

medium risk level at T₂ and low risk level all for other samples. According to Tytla's (2019) classification, the ERF analysis showed a low contamination levels for all the TEs in the nine

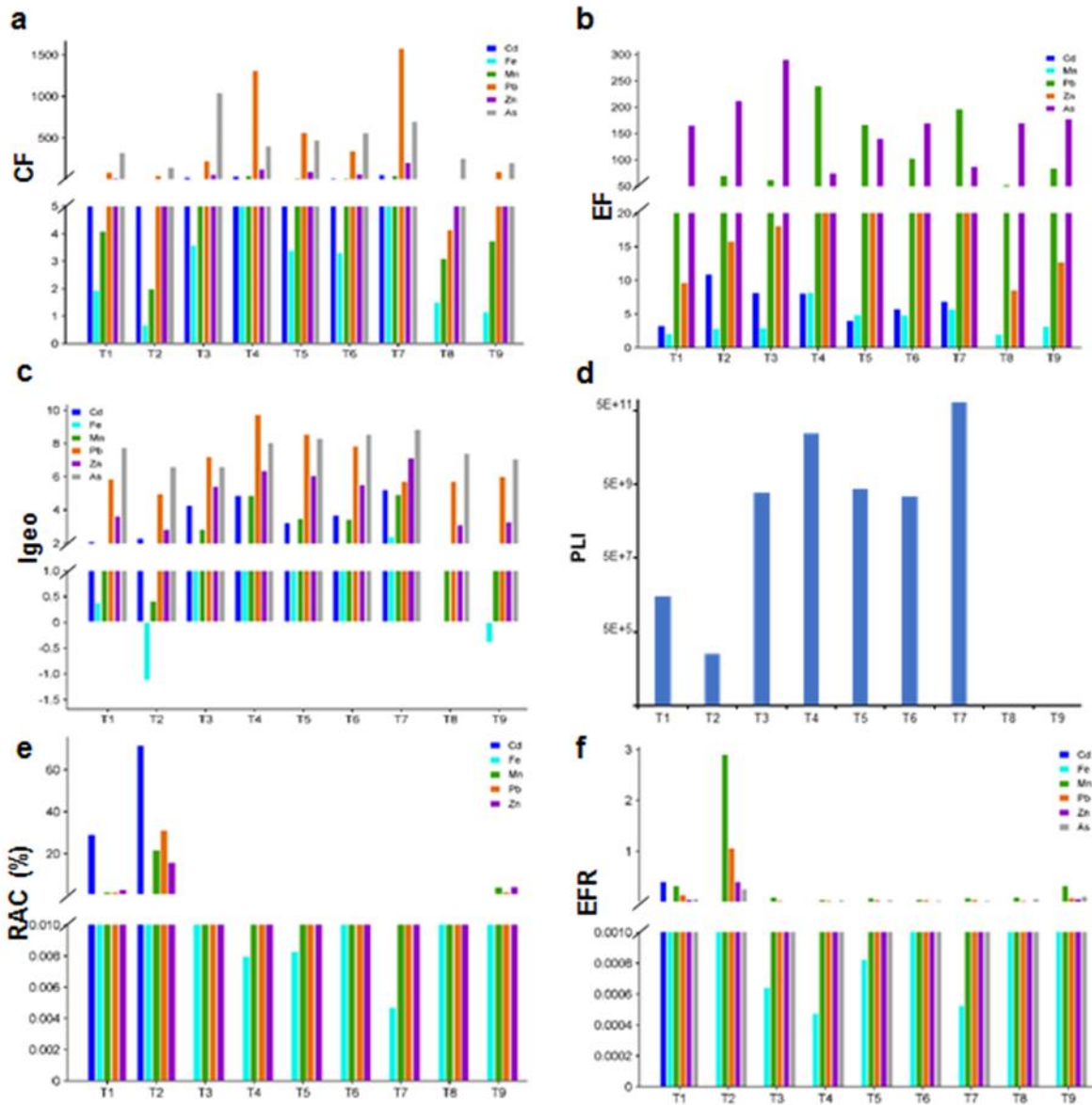


Fig 6. Contamination and enrichment factors (EF) of different soil samples T₁, T₂, and T₃: upstream of the Tamra mine, T₄, T₅, and T₆: in the middle of the Tamra mine and T₇, T₈, T₉: downstream of the Tamra mine: a) the enrichment factor (EF), b) the contamination factor (CF), c) geoaccumulation Index (I_{geo}), d) pollution Load Index (PLI), e) risk assessment code (RAC), f) environmental Risk Factor (ERF).

samples. However, Mn and Pb exhibited high risk in sample T₂, while Cd presented a medium risk in sample T₁ (Fig. 6f).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

3.6. Pollution indices and Risk Assessment

3.6.1. Enrichment factor

All pollution indices analyzed in this study provide a comprehensive assessment of trace metal enrichment, contamination, and environmental risk across the Tamra mine area. The EF values for Cd in samples T₈ and T₉ were null (Fig. 6a), suggest that these elements originate solely from natural weathering processes in these two sampling points (Hamzehpour and Marcolli 2024). In contrast, EF values greater than 1 for Mn, Zn, Pb, Cd and As, in most of the samples from upstream, downstream and middle section of the mine, indicate an anthropogenic origin (Mostafa et al. 2024). Furthermore, the elevated enrichment values of these TEs near the iron mining area signal significant soil pollution resulting from Fe mining activities (Pandey et al. 2016). EF of Pb and As were extremely high ($EF > 40$), indicating severe anthropogenic pollution. Similar observations were reported at the Jebel Ressas mining site in Tunisia, where Zn, Pb, Cd, and As indicate an anthropogenic source of pollution (Yousfi et al. 2019).

3.6.2. Contamination factor

The CF values of Zn, Pb and As reflect very high contamination in most samples from all 3 study sites (upstream, downstream and mid-mine), showing severe pollution of these areas (Fig. 6b) (Nde et al. 2024). Samples with lower CF values suggest these locations are less impacted by contamination. In the middle of the mine, CF values range from very high contamination for most metals (Zn, Mn, Pb, Cd and As) to high contamination for Fe, indicating that although iron is the most abundant element in this study (Fig. 3a), its contamination is comparatively lower due to its more stable mineralogical form (Timofeeva et al. 2024).

3.6.3. Geoaccumulation index

According to Buccolieri et al. (2006) Igeo values across most locations show varying degrees of pollution, from moderate to heavy to extremely polluted for the studied elements (except for iron, Fig. 6c). Sampling points close to iron mining area are severely polluted with Zn, Pb, and As, showing that these elements are strongly influenced by mining activities (Sun et al. 2018).

3.6.4. Pollution load index

The PLI indicates that soils upstream and in the middle of the mine are degraded soils (Fig. 6d). Sample T₇ was the most polluted, followed by sample T₄, and poses a significant environmental

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

risk for the studied elements, as these samples had the highest PLIs in the study area (Taghavi et al. 2024).

3.6.5. Risk assessment code

According to the RAC, studied elements generally exhibit no to low environmental pollution risk across the majority of sampling locations (Fig. 6e).

Similar observations were reported at the abandoned Pb-Zn mine in northeast of Algeria and the Fedj Lahdoun mine in northern Tunisia, where the majority of TEs were associated with non-labile fractions (Sebei et al. 2020; Bouzid et al. 2021). This distribution indicates limited mobility, suggesting a lower immediate environmental risk. The high concentration of TEs in the residual fraction is the reason for low risk Cd is a toxic element even at low concentration, and its high to very high mobility upstream of the mine indicates a potential risk for serious environmental contamination. Similar trends have been reported at the Jebal Ressay mining site (Yousfi et al. 2019) and in several mining districts of northern Tunisia (Jebal Hallouf, Sidi Bouaoune, Jebal Ghoulane, Hammam Zriba, and Jalta), where Cd was also found to be highly mobilized (Achour et al. 2022).

The RAC assessment classifies T₂ as posing a moderate to very high environmental risk, indicating a predominance of labile metal fraction with greater solubility and mobility toward the ecosystem and groundwater (Elmayel et al. 2020).

3.6.6. Environmental risk factor

The ERF analysis for the sampling points is shown in Figure 6f. The ERF analysis indicated a low level of contamination for all TEs at the three iron mine sites (upstream, midstream, and downstream), except for Cd at site T₁, which presents a medium contamination risk, and Mn and Pb at sites T₂. This is due to their higher content in the exchangeable fractions and reducible fractions (Liu et al. 2016). Although Zn, As, Cd, and Pb were mainly related to residual and oxidizable fractions, these elements can pose health and environmental risks for local populations (Wang et al. 2024).

By integrating multiple pollution indices, this study underscores the anthropogenic impact of iron mining on soil contamination. Serious anthropogenic pollution of Pb and As requires urgent solutions. Key hotspots, such as samples T₄ and T₇, highlight areas requiring urgent intervention. Cd at T₂ and T₁ also needs particular attention. Comparable findings were reported in an iron ore mine in Malaysia, where the studied TEs mainly originated from anthropogenic

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

activities. Similar to this study, multiple pollution indices consistently indicated severe contamination, underscoring a significant threat to the ecological health of the area (Abdullah et al. 2023). It is critical, however, to distinguish these assessments of geochemical contamination from direct ecological risk. While indices such as CF, Igeo, and PLI reveal elevated total concentrations of elements like Cd, Pb, and As, confirming significant anthropogenic pollution, this does not automatically translate to equivalent biological uptake or toxicity. The actual ecological risk is mediated by element speciation and bioavailability, which are controlled by site-specific soil properties such as pH, organic matter content, and cation exchange capacity. This key distinction is underscored by the ERF results, which, by considering chemical fractions, indicate a lower and more variable risk for most elements, with notable exceptions like Cd, Mn, and Pb in specific soils where their labile proportions are elevated.

While such diagnostic studies are essential for identifying contamination, translating these findings into practical, scalable remediation strategies remain a key challenge. To address this, our findings in the Tamra iron mine (Ayadi et al. 2025) evaluate a novel biochar-plant system, indicating a promising synergistic effect between Eucalyptus-derived biochar and *Casuarina glauca* for remediating soils contaminated with multiple trace metals (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, As). This integrated system functions as a scalable model for sustainable land rehabilitation by 1) immobilizing specific metals (Fe, As, Pb), 2) mitigating abiotic stress to aid plant establishment, and 3) facilitating the bioaccumulation of others metals (Cd, Mn, Zn) through plant-soil interactions and symbiotic processes.

4. Conclusion

This study assessed the concentration, spatial distribution, and environmental risks of TEs (Fe, Mn, Zn, Pb, Cd, and As) in soils sampled from an iron ore mine site (upstream, downstream, and in the middle). The sampling strategy was designed to ensure representativeness by systematically targeting zones reflecting key environmental and anthropogenic gradients: upstream reference zones (to establish uncontaminated geochemical baselines), areas directly affected by mining activities such as waste piles and processing sites (to characterize primary source terms), and downstream locations (to assess contaminant dispersion and attenuation

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

along hydrological flow paths), thereby ensuring the collective samples capture the full spatial variability of mining impacts from source to sink.

The results showed that TE concentrations significantly exceeded soil quality standards, indicating considerable contamination across the study area. Through comprehensive physical, chemical, and mineralogical soil analyses, coupled with the sequential extraction method, the main factors controlling the TE migration, pollution severity and ecological risk were identified. The present study is limited to surface soil contamination and geochemical risk assessment and does not address vertical TE migration or biological effects. Additional investigations, including deeper soil profiling and biological assessments (e.g., plant uptake and bioavailability), were also conducted and have already been the subject of a recently published article (Ayadi et al. 2025), while further results will be presented in future publications.

The residual and Fe-Mn oxide fractions were found to dominate fractions of Mn, Zn, Pb, and Cd in most samples, while Fe and As are consistently associated with residual fractions in all samples with different proportions. Key factors such as pH, EC, and iron oxides emerged as critical determinants of the TE mobility. The EF indicated that Pb and As are serious anthropogenic pollutants requiring remediation solutions.

The CF suggested very high levels of contamination by Cd, Mn, Pb, Zn and As, particularly in areas close to mining activity. The Igeo revealed pollution levels ranging from moderately to heavily polluted to extremely polluted for most elements, except iron. Sampling points near mining activities showed severe contamination with Zn, Pb, and As, underscoring the influence of mining activities on these elements. The PLI indicated that soils located upstream and midstream of the mine exhibit signs of degradation, with specific sites (T₄ and T₇) posing significant environmental pollution risks. Additionally, cadmium presents a serious contamination risk upstream of the mine. The ERF analysis suggested low contamination levels for most TEs across the three sites, except for Cd (medium risk in soil T₁) and Mn and Pb, which present a contamination risk due to the high percentage of their labile fractions for soil T₂. Overall, these findings highlight the urgent need for targeted management and remediation strategies particularly for Zn, Pb, As, and Cd, to mitigate the impact of TEs in the affected areas. The study provides essential baseline data for designing remediation measures and monitoring programs and informing policy decisions aimed at sustainable management in mining-impacted regions. Consequently, moving from pollution assessment to practical remediation, our results

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

support the implementation of a specific, scalable biochar-assisted phytostabilization system. The demonstrated synergy between Eucalyptus-derived biochar and *Casuarina glauca* offers a targeted management strategy to immobilize key contaminants (As, Pb, Fe) and facilitate the bioaccumulation of others (Cd, Mn, Zn) for sustainable site rehabilitation. However, the definitive validation of this strategy's long-term risk reduction hinges on integrating vegetation-based monitoring to track these critical bioaccumulation trends. These results offer valuable guidance for long-term mine rehabilitation in Tunisia by identifying priority contaminants, vulnerable areas, and management strategies to reduce environmental and ecological risks.

References

- Abdallah RB, Abdelmalak M M, Augland L E, Lazaar S, Polteau S, Callegaro S, Rossetti L M (2024) Miocene magmatism in Northern Tunisia and its geodynamic implications. *Mediterr Geosci Rev* 6: 269-292. <https://doi.org/10.1007/s42990-024-00139-1>
- Abdullah M Z, Sulaiman F R, Zainuddin N S A, Ab Manan W N A, Ahmad N (2023) The concentration of heavy metals and pollution indices in a selected abandoned mine in the State of Pahang, Malaysia. *Journal of Degraded & Mining Lands Management* 10.4. DOI :10.15243/jdmlm.2023.104.4829
- Achour Y, Souissi R, Tlil H, Souissi F, Motelica-Heino M (2022) Mobility of Potentially Toxic Elements (Pb, Zn, Cd, As, Sb) in Agricultural Carbonated Soils Contaminated by Mine Tailings (Northern Tunisia): A New Kinetic Leaching Approach with Organic Acids. *Water* 14: 3337. <https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.3390/w14203337>
- Adnan M, Xiao B, Ali M U, Xiao P, Zhao P, Wang H, Bibi S (2024) Heavy metals pollution from smelting activities: A threat to soil and groundwater. *Ecotoxicol Environ Saf* 274: 116189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116189>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2008.07.015>
- Association Française de Normalisation (1995) XP-P94-041. Sols : reconnaissance et essais – Identification granulométrique. Méthode de tamisage par voie humide. Paris: Association Française de Normalisation 11 p.
- Ayadi O, Tlili K, Bourgerie S, Bejaoui Z (2025) Eucalyptus-Biochar Application for Mitigating the Combined Effects of Metal Toxicity and Osmotic-Induced Drought in *Casuarina glauca* Seedlings. *Land*: 14.7: 1423. <https://doi.org/10.3390/land14071423>
- Ayari J, Barbieri M, Barhoumi A, Boschetti T, Braham A, Dhaha F, Charef A (2023) Trace metal element pollution in media from the abandoned Pb and Zn mine of Lakhouat, Northern Tunisia. *J Geochem Explor* 247: 107180. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2023.107180>

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- Ballabio C, Jones A, Panagos P (2024) Cadmium in topsoils of the European Union—an analysis based on LUCAS topsoil database. *Science of the Total Environment* 912: 168710. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168710>
- Barbieri M (2016) The importance of enrichment factor (EF) and geoaccumulation index (Igeo) to evaluate the soil contamination. *J Geol Geophys* 5: 1-4. <http://dx.doi.org/10.4172/2381-8719.1000237>
- Barrow N J, Hartemink A E (2023) The effects of pH on nutrient availability depend on both soils and plants. *Plant Soil* 487: 21-37. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05960-5>
- Bhat A A, Moglad E, Bansal P, Kaur H, Deorari M, Thapa R, Almaliki W H, Kazmi I, Alzarea S I, Kukreti N, Ali H (2024) Pollutants to Pathogens: The Role of Heavy Metals in Modulating TGF- β Signaling and Lung Cancer Risk. *Pathol Res Pract* 155260. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155260>
- Biyazen B B, Taye A E (2024) Potential toxic metal concentration and risk assessment in agricultural soil and lentil crop (*Lens culinaris Medik*) in Dawunt Woreda, northwest Wollo, Ethiopia. *J Toxicol* 2024: 8985402. <https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.1155/2024/8985402>
- Borch T, Kretzschmar R, Kappler A, Cappellen PV, Ginder-Vogel M, Voegelin A, & Campbell K (2010) Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environmental science & technology* 44: 15-23. <https://doi.org/10.1021/es9026248>
- Bouزيد K, Boutaleb A, Toumi M (2021) Trace metals distribution and fractionation in soils around the abandoned “Ichmoul” Pb-Zn mill-mine, North-East of Algeria. *Pollution* 7: 511-526. <https://doi.org/10.22059/poll.2021.317521.1003>
- Bouزيد W, Mezned N, Abdeljaoued S (2022) Mineralogical mapping using EO-1 Hyperion data for iron mine identification. *J Appl Remote Sens* 16: 024514-024514. <https://doi.org/10.1117/1.JRS.16.024514>
- Buccolieri A, Buccolieri G, Cardellicchio N, Dell'Atti A, Di Leo A, Maci A (2006) Heavy metals in marine sediments of Taranto Gulf (Ionian Sea, southern Italy). *Mar chem* 99: 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.09.009>
- CCME (1997) Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health- Arsenic (inorganic), Canadian Council of Ministers of the Environment.
- CCME (1999) Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health-Cadmium, Canadian Council of Ministers of the Environment.
- CCME (2018) Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health-Zinc, Canadian Council of Ministers of the Environment.
- CCME (2025) Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health-Lead, Canadian Council of Ministers of the Environment.
- Chen S, Chen B, Xu H, Li H, Li S, Liang Y (2024) Comprehensive investigation of pollution levels and potential bioavailable risks of 7 potentially toxic elements in Qinghai-Tibet soils by using diffusive gradients in thin-films (DGT). *Environ Pollut Bioavailab* 36 : 2357297. <https://doi.org/10.1080/26395940.2024.2357297>

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- Chen T, Wen X, Zhou J, Lu Z, Li X, Yan B (2023) A critical review on the migration and transformation processes of heavy metal contamination in lead-zinc tailings of China. *Environ Pollut*: 122667. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122667>
- Cui J, Li H, Shi Y, Zhang F, Hong Z, Fang D, Jiung J, Wang Y, Xu R (2024) Influence of soil pH and organic carbon content on the bioaccessibility of lead and copper in four spiked soils. *Environ Pollut* 360: 124686. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124686>
- da Silva Barboza F, Stumpf L, Pauletto E A, de Lima C L R, Pinto L F S, Jardim T M, Pimentel J P, Albert R P, Vivan G A (2021) Impact of machine traffic events on the physical quality of a mine soil after topographic reconstruction. *Soil Tillage Res* 210: 104981. <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.104981>
- da Silva Y J A B, do Nascimento C W A, van Straaten P, Biondi C M, de Souza Júnior V S, da Silva Y J A B (2017) Effect of I-and S-type granite parent material mineralogy and geochemistry on soil fertility: A multivariate statistical and Gis-based approach. *Catena* 149: 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.09.001>
- Decrée S, De Putter T, Yans J, Moussi B, Recourt P, Jamoussi F, Bruyère D, Dupuis C (2008) Iron mineralisation in Mio-Pliocene sediments of the Tamra iron mine (Nefza mining district, Tunisia): Mixed influence of pedogenesis and hydrothermal alteration. *Ore Geol Rev* 33: 397-410. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2007.02.001>
- Decrée S, Marignac C, De Putter T, Yans J, Clauer N, Dermech M, Aloui K, Baele J M (2013) The Oued Belif hematite-rich breccia: A Miocene iron oxide Cu-Au-(U-REE) deposit in the Nefza mining district, Tunisia. *Econ Geol* 108: 1425-1457. <https://doi.org/10.2113/econgeo.108.6.1425>
- Decrée S, Ruffet G, De Putter T, Baele J M, Recourt P, Jamoussi F, Yans J (2010) Mn oxides as efficient traps for metal pollutants in a polyphase low-temperature Pliocene environment: A case study in the Tamra iron mine, Nefza mining district, Tunisia. *J Afr Earth Sci* 57: 249-261. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2009.08.005>
- Dekoninck A, Moussi B, Vennemann T, Jamoussi F, Mattielli N, Decrée S, Chaftar R H, Hatira N, Yans J (2018) Mixed hydrothermal and meteoric fluids evidenced by unusual H-and O-isotope compositions of kaolinite-halloysite in the Fe (-Mn) Tamra deposit (Nefza district, NW Tunisia). *Appl Clay Sci* 163 : 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.07.007>
- Dong Y, Gao Z Di J, Wang D, Yang Z, Guo X, Zhu X (2024) Study on the effectiveness of sulfate-reducing bacteria to remove Pb (II) and Zn (II) in tailings and acid mine drainage. *Front in Microbiol* 15: 1352430. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1352430>
- Elmayel I, Esbrí J M, Efrén G O, García-Noguero E M, Elouear Z, Jalel B, Farieri A, Roqueni N, Cienfuegos P, Higuera P (2020) Evolution of the speciation and mobility of Pb, Zn and Cd in relation to transport processes in a mining environment. *Int J environ res public health* 17: 4912. <https://doi.org/10.3390/ijerph17144912>

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- Ergin M, Saydam C, Baştürk Ö, Erdem E, Yörük R (1991) Heavy metal concentrations in surface sediments from the two coastal inlets (Golden Horn Estuary and Izmit Bay) of the northeastern Sea of Marmara. *Chemical geology*, 91(3), 269-285.
- Fan Q, Wang L, Fu Y, Li Q, Liu Y, Wang Z, Zhu H (2023) Iron redox cycling in layered clay minerals and its impact on contaminant dynamics: A review. *Sci Total Environ* 855: 159003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159003>
- FAO (2004) Maximum Limits for Dangerous Substances in Soil and Groundwater. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2015) Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/i5199e/i5199e.pdf>. Accessed 27 May 2025
- Fau A, Beyssac O, Gauthier M, Meslin P Y, Cousin A, Benzerara K, Bernard S, Boulliard J C, Gasnault O, Forn, O, Wiens R C, Morand M, Rosier P, Garino Y, Pont S, Maurice S (2019) Pulsed laser-induced heating of mineral phases: Implications for laser-induced breakdown spectroscopy combined with Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc* 160: 105687. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105687>
- Fu B, Xu G, Hower J C, Cao Y, Huang Y, Si L, Xian L, Luo G, Liu G, Yao H (2024) Recognition and (semi-) quantitative analysis of REE-bearing minerals in coal using automated scanning electron microscopy. *Int J Coal Geol* 282: 104443. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2023.104443>
- Górska A, Markiewicz-Gospodarek A, Trubalski M, Żerebiec M, Poleszak J, Markiewicz R (2024) Assessment of the Impact of Trace Essential Metals on Cancer Development. *Int J Mol Sci* 25: 6842. <https://doi.org/10.3390/ijms25136842>
- Hakanson L (1980) An ecological risk index for aquatic pollution control. A sedimentological approach. *Water Res* 14: 975-1001. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(80\)90143-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90143-8)
- Hamzehpour N, Marcolli C (2024) Soil crust development on playa surfaces of Lake Urmia and its controlling factors: New insights to combat dust sources. *Catena* 237: 107799. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2023.107799>
- He P, Li X, Zou D, Tang F, Li Y (2025) Environmental factors inducing gastric cancer: insights into risk and prevention strategies. *Discov Oncol* 16: 1-19. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-01771-5>
- Hu H, Zhang Q, Wang C, Chen M, Chen M (2022) Mechanochemically synthesized Fe-Mn binary oxides for efficient As (III) removal: insight into the origin of synergy action from mutual Fe and Mn doping. *J Hazard Mater* 424: 127708. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127708>
- Hu J, Wang Z, Williams G D, Dwyer G S, Gatiboni L, Duckworth O W, Vengosh A (2024) Evidence for the accumulation of toxic metal (loid) s in agricultural soils impacted from long-term application of phosphate fertilizer. *Sci Total Environ* 907: 167863. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167863>
- INM (2020) Annuaire des données pluviométriques. Tunis. Min Env. INM_2020
- Jain CK (2004) Metal fractionation study on bed sediments of river Yamuna, India. *Water Res* 38: 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.042>

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- Jerbi H, Sebai A, Hamlaoui I, Hamdi M, Hmida N (2023) 3D hydrostratigraphic modeling and hydro-geophysical aquifer conceptualization for groundwater storage assessment: the case study of Nefza massive dunes (Northern Tunisia). *Environ Earth Sci* 82: 116. <https://doi.org/ezproxy.univ-orleans.fr/10.1007/s12665-023-10805-6>
- Kharazian P (2023) Investigation on Revegetation/Phytoremediation of Campo Pisano abandoned mine area.
- Li B, Wei D, Zhou Y, Huang Y, Tie B, Lei M (2021) Mechanisms of arsenate and cadmium co-immobilized on ferrihydrite inferred from ternary surface configuration. *Chem Eng J* 424: 130410. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130410>
- Li X C, Yang Z Z, Zhang C, Wei J J, Zhang H Q, Li Z H, Wei J J, Zhang H Q, Li Z H, Ma C, Wang M S, Chen J Q, Hu J W (2019) Effects of different crystalline iron oxides on immobilization and bioavailability of Cd in contaminated sediment. *Chem Eng J* 373: 307-317. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.015>
- Liang J, Liu J, Yuan X, Zeng G, Yuan Y, Wu H, Li F (2016) A method for heavy metal exposure risk assessment to migratory herbivorous birds and identification of priority pollutants/areas in wetlands. *Environ Sci & Pollu Res* 23 : 11806-11813. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6372-3>
- Liu G, Wang J, Zhang E, Hou J, Liu X (2016) Heavy metal speciation and risk assessment in dry land and paddy soils near mining areas at Southern China. *Environ Sci Pollut Res* 23: 8709-8720. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6114-6>
- Liu J, Wang Y, Li Y, Peñuelas J, Zhao Y, Sardans J, Tetzlaff D, Liu J, Liu X, Yuan H, Chen J, Wu J (2023) Soil ecological stoichiometry synchronously regulates stream nitrogen and phosphorus concentrations and ratios. *CATENA*. 231:107357. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2023.107357>
- Liu Z, Dai Z, Yu F, Tong K, Guo J, Huang K, Qin S, Chen S (2025) Comprehensive investigation into the effects of oxygen concentration on pyrite oxidation processes and key ion migration patterns in black rock layers. *Case Stud Constr Mater* 22: e04226. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2025.e04226>
- Lu P H, He Y, Zhang Z, Ye W M (2021) Predicting chemical influence on soil water retention curves with models established based on pore structure evolution of compacted clay. *Comput Geotech* 138: 104360. <https://doi.org/10.1016/j.compgeo.2021.104360>
- Luo J, Li J, Feng S, Ke X (2025) Early-warning ecological risk assessments of multi-element pollution in the surface soil of karst basins in southwest China based on the delayed geochemical hazard model. *J Hazard Mater* 485: 136935. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136935>
- Maalaoui F, Kraiem Z, Bouhlef S, Sadik C, Sdiri A (2024) Predicting iron contents in the Tamra-Douahria mining site using a deep neural network approach. *J Taibah Univ Sci* 18: 2422646. <https://doi.org/10.1080/16583655.2024.2422646>
- Medina G, Del Bosque I S, Frías M, De Rojas M S, Medina C (2017) Granite quarry waste as a future eco-efficient supplementary cementitious material (SCM): Scientific and technical considerations. *J Clean Prod* 148: 467-476. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.048>

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- Mertz S, Devau N, Thouin H, Battaglia-Brunet F, Norini M P, Crampon M, Le Forestier L (2025) Leaching of pollutant metals (Pb, Zn) from abandoned mine tailings: A multicomponent reactive transport model of a pilot-scale experiment. *Sci Total Environ* 960: 178248. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.178248>
- Mishra S, Patel A, Bhatt P, Chen S, Srivastava P K (2024) Perspective Evaluation of Synthetic Biology Approaches for Effective Mitigation of Heavy Metal Pollution. *Rev Environ Contam Toxicol* 262: 21. <https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.1007/s44169-024-00072-2>
- Mostafa M T, El-Nady H, Gomaa R M, Abdelgawad H F, Abdelhafiz M A, Salman S A E, Khalifa I H (2024) Urban geochemistry of heavy metals in road dust from Cairo megacity, Egypt: Enrichment, sources, contamination, and health risks. *Environ Earth Sci* 83: 37. <https://doi.org/10.1007/s12665-023-11342-y>
- Mousavi S M, Raiesi T, Sedaghat A, Srivastava A K (2023) Potentially Toxic Metals: Their Effects on the Soil-Human Health Continuum. *J adv environ health res* 12: 86-101. <https://doi.org/10.34172/jaehr.1328>
- Muller G (1969) Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. *Geol J* 2: 109- 118.
- Mumba E J, Selemani J R, Kasambala H R, Bidu J M, Ripanda A S, Rwiza M J (2025) Dust exposure and its health implications to miners in Mererani artisanal and small-scale mining industry. *Int J Environ Anal Chem*: 1-23. <https://doi.org/10.1080/03067319.2024.2448546>
- Munyai R, Ogola H J O, Modise D M (2021) Microbial community diversity dynamics in acid mine drainage and acid mine drainage-polluted soils: implication on mining water irrigation agricultural sustainability. *Front Sustain Food Syst* 5: 701870. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.701870>
- Nasraoui R, Fkih Romdhan D, Charef A, Ayari J (2022) Assessment of the historical evolution of the total and labile Pb, Zn, and Cd fractions and their environmental risks of the Jbel Ressas tailings and agricultural soil (NE Tunisia). *Environ Earth Sci* 81: 472. <https://doi.org/10.1007/s12665-022-10610-7>
- Nassiri O, Rhoujjati A, Moreno-Jimenez E, Hachimi M L E (2023) Environmental and geochemical characteristics of heavy metals in soils around the former mining area of zeïda (high moulouya, Morocco). *Water Air Soil Pollut* 234: 110. <https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.1007/s11270-023-06103-3>
- Nde S C, Felicite O M, Aruwajoye G S, Palamuleni L G (2024) A meta-analysis and experimental survey of heavy metals pollution in agricultural soils. *J Trace Elem Miner* 9: 100180. <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2024.100180>
- Ng J F, Ahmed O H, Omar L, Jalloh M B, Kwan Y M, Musah A A, Chowdhury A J K (2024) Improving soil pH, pH buffering capacity, and ECEC of an acid soil to regulate nutrient retention and mitigate water pollution. *Desalination Water Treat*: 100491. <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100491>
- Nieder R, Benbi D K (2024) Potentially toxic elements in the environment—a review of sources, sinks, pathways and mitigation measures. *Rev Environ Health* 39: 561-575. <https://doi.org/10.1515/reveh-2022-0161>
- Páez-Bimos S, Molina A, Calispa M, Delmelle P, Lahuatte B, Villacís M, Muñoz T, Vanacker V (2023) Soil–vegetation–water interactions controlling solute flow and chemical weathering in volcanic ash soils of the high Andes. *Hydrol Earth Syst Sci* 27: 1507-1529. <https://doi.org/10.5194/hess-27-1507-2023>

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- Pandey A, Rampe E B, Ming D W, Deng Y, Bedford C C, Schwab P (2023) Quantification of amorphous Si, Al, and Fe in palagonitic Mars analogs by chemical extraction and X-ray spectroscopy. *Icarus* 392: 115362. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2022.115362>
- Pandey B, Agrawal M, Singh S (2016) Ecological risk assessment of soil contamination by trace elements around coal mining area. *J Soils Sediments* 16: 159–168. <https://doi.org/ezproxy.univ-orleans.fr/10.1007/s11368-015-1173-8>
- Pansu M, Gautheyrou J (2006) *Handbook of soil analysis*. Springer.
- Pérez-Cid B, Lavilla I, Bendicho C (1998) Speeding up of a three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound. *Anal Chim Acta* 360: 35-41. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00718-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00718-6)
- Perin G, Craboledda L, Lucchese M, Cirillo R, Dotta L (1985) Heavy metal speciation in the sediments of Northern Adriatic Sea: a new approach for environmental toxicity determination.
- Qu F, Zheng W (2024) Cadmium Exposure: Mechanisms and Pathways of Toxicity and Implications for Human Health. *Toxics* 12: 388. <https://doi.org/10.3390/toxics12060388>
- Räty M, Keskinen R, Yli-Halla M, Hyvönen J, Soinnie H (2021) Estimating cation exchange capacity and clay content from agricultural soil testing data. *Agric Food Sci* 30: 131-145. <https://doi.org/10.23986/afsci.111107>
- Ren J, He G, Yang Y, Yu M, Deng Y, Pang Y, Zhao B, Yao H (2024) Ultrasensitive enrichment of trace elements in seawater by Co-rich ferromanganese nodules. *Glob. Planet. Chang.* 2024, 239: 104498, <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2024.104498>.
- Rodríguez L, Ruiz E, Alonso-Azcárate J, Rincón 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.04.007>.
- Rouvier H, Perthuisot V, Mansouri A (1985) Pb-Zn deposits and salt-bearing diapirs in Southern Europe and North Africa. *Econ Geol* 80: 666-687. <https://doi.org/10.2113/gsecongeo.80.3.666>
- Sai Kachout, S, Ennajah A, Guenni K, Ghorbel N, Zoghlami A (2024) Potential of halophytic plant *Atriplex hortensis* for phytoremediation of metal-contaminated soils in the mine of Tamra. *Soil Sediment Contam* 33: 139-154. <https://doi.org/10.1080/15320383.2023.2185469>
- Schindler M, Akbari Alavijeh M, Oliveira M L, Silva L F (2024) A review of analytical techniques to characterise nanomaterial associations with minerals, organic matter and organisms. *Geostand Geoanal Res* 49: 133-159. <https://doi.org/10.1111/ggr.12583>
- Salhi R, Durães N, Dhaoui M, Patinha C, da Silva E F, Mlayah A (2023) Contamination assessment and availability of potential toxic elements from the Sidi Driss tailing pile (NW Tunisia) based on geochemical and geophysical methods. *J Afr Earth Sci* 202: 104921. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2023.104921>
- Sebei A, Chaabani A, Abdelmalek-Babbou C, Helali M A, Dhahri F, Chaabani F (2020) Evaluation of pollution by heavy metals of an abandoned Pb-Zn mine in northern Tunisia using sequential fractionation and geostatistical mapping. *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 43942-43957. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10101-x>

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- Shi B, Li H, Fu X, Zhao C, Wang A H, Tan W, Rao Y, Li M, Komarneni S, Yang H (2024) Insight into the key role of imine groups in polyaniline for adsorbing heavy metal ions: Density functional theory and experimental study. *Sep Purif Technol* 335: 125866. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.125866>
- Sintorini M M, Widyatmoko H, Sinaga E, Aliyah N (2021) Effect of pH on metal mobility in the soil. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 737: 012071. IOP Publishing. doi:10.1088/1755-1315/737/1/012071
- Su Y, Cui YJ, Dupla JC, Canou J (2021) Soil-water retention behaviour of fine/coarse soil mixture with varying coarse grain contents and fine soil dry densities. *Canadian Geotech Jour* 59: 2. <https://doi.org/10.1139/cgj-2021-0054>
- Sun Z, Xie X, Wang P, Hu Y, Cheng H (2018) Heavy metal pollution caused by small-scale metal ore mining activities: A case study from a polymetallic mine in South China. *Sci Total Environ* 639 : 217-227. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.176>
- Sundaray S K, Nayak B B, Lin S, Bhatta D (2011) Geochemical speciation and risk assessment of heavy metals in the river estuarine sediments—a case study: Mahanadi basin, India. *J Hazard Mater* 186:1837–1846. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.081>
- Surour A A (2024) Updating Geological Information About Selected Non-metallic Ore Deposits in North Africa. In *the Geology of North Africa Cham: Springer International Publishing*, pp 323-346
- Sutherland R A (2000) Bed sediment-associated trace metals in an urban stream, Oahu, Hawaii. *Environ Geol* 39: 611-627. <https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.1007/s002540050473>
- Taghavi M, Bakhshi K, Zarei A, Hoseinzadeh E, Gholizadeh A (2024) Soil pollution indices and health risk assessment of metal (loid) s in the agricultural soil of pistachio orchards. *Sci Rep* 14: 8971. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59450-4>
- Tessier APGC, Campbell PG, Bisson M J AC (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical chemistry*, 51: 844-851. <https://doi.org/10.1021/ac50043a017>.
- Tian Y, Qu G, Xu R, Liu X, Jin C (2024) Iron-based materials for immobilization of heavy metals in contaminated soils: a critical review. *J Environ Chem Eng*: 113741. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.113741>
- Timofeeva Y, Karabtsov A, Burdukovskii M, Vzorova D (2024) Strontium and vanadium sorption by iron-manganese nodules from natural and remediated Dystric Cambisols. *J Soils Sediments* 24: 1220-1236. <https://doi.org/10.1007/s11368-024-03714-z>
- Tomlinson D L, Wilson J G, Harris C R, Jeffrey D W (1980) Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. *Helgol Meeresunters* 33: 566-575. <https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.1007/BF02414780>
- Trifi M, Dermech M, Abdelkrim C, Azouzi R, Hjiri B (2018) Extraction procedures of toxic and mobile heavy metal fraction from complex mineralogical tailings affected by acid mine drainage. *Arab J Geosci* 11: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12517-018-3612-5>
- Turekian K K, Wedepohl K H(1961) Distribution of the elements in some major units of the earth's crust. *Geol Soc Am Bull*, 72(2), 175-192. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1961\)72\[175:DOTEIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1961)72[175:DOTEIS]2.0.CO;2)

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- Tyła M (2019) Assessment of heavy metal pollution and potential ecological risk in sewage sludge from municipal wastewater treatment plant located in the most industrialized region in Poland—case study. *Int J Environ Res Public Health*, 16(13), 2430. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16132430>
- Walkley A, Black I A (1934) An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci*, 37(1), 29-38.
- Wang X, Dai Z, Lin J, Zhao H, Yu H, Ma B, Hu L, Shi J, Chen X, Liu M, Ke X, Yu Y, Dahlgren R A, Xu J (2023) Heavy metal contamination collapses trophic interactions in the soil microbial food web via bottom-up regulation. *Soil Biol Biochem* 184: 109058. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2023.109058>
- Wang M, Liu H, Zhou W (2024) Chemical Speciation, Contamination, Human Health Risk Assessment, and Source Identification of Heavy Metals in Soils Composted with Swine Manure. *Soil Sediment Contam*: 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.169877>
- Wiem B A, Véronique G, Rania B A, Abdessalem B H A, Said T, Lassaad B A (2023) Geochemistry and PT Conditions of Hydrothermal Fluids Associated with Porphyry, Metasomatic and Epithermal Ore Deposits at Oued Belif-Ain El Araar Magmatic Structure (North-African Alpine Orogeny, Tunisia). *Geol Ore Depos* 65: 625-643. <https://doi.org/10.1134/S1075701523060028>
- Wu M W, Dong W J, Guan D X, Li S W, Ma L Q (2024) Total contents, fractionation and bioaccessibility of nine heavy metals in household dust from 14 cities in China. *Environ Res* 243: 117842. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117842>
- Xie J, Wang D, Chen Y, Li Z, Dai W, Huang R, Wang Z, Gao M (2024) Neutral purple soil acidification and mineralogical property changes due to long-term urea application in southwest China. *Soil Tillage Res* 244: 106227. <https://doi.org/10.1016/j.still.2024.106227>
- Yang X, Zhou Y, Hu J, Zheng Q, Zhao Y, Lv G, Liao L (2024) Clay minerals and clay-based materials for heavy metals pollution control. *Sci Total Environ* : 176193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176193>
- Yousfi R, El Ouear Z, Dahri N, Ouddane B, Rigane H (2019) Evaluating the heavy metals-associated ecological risks in soil and sediments of a decommissioned Tunisian Mine. *Pol J Environ Stud* 28 : 2981-2993. <https://doi.org/10.15244/pjoes/86198>
- Yu H, Li C, Yan J, Ma Y, Zhou X, Yu W, Kan H, Meng Q, Xie R, Dong P (2023) A review on adsorption characteristics and influencing mechanism of heavy metals in farmland soil. *RSC advances* 13: 3505-3519. <https://doi.org/10.1039/d2ra07095b>
- Zhang H, Selim H M (2008) Reaction and transport of arsenic in soils: equilibrium and kinetic modeling. *Adv Agron* 98: 45-115. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)00202-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00202-2)
- Zhang X, Zhang S, Wei X, Liu Z, Wang C, Mu H, Han Y, Liu C (2024) Identification of sources and analysis of spatial distribution of soil heavy metals in northern China coal mining areas. *Environ Geochem Health* 46: 94. <https://doi.org/10.1007/s10653-024-01877-9>
- Zheng J, Jiang M, Li Q, Yang W (2024) The formation and stability of HA–Fe/Mn colloids in saturated porous media. *Environments* 11 : 136. <https://doi.org/10.3390/environments11070136>

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Zhou J, Moore R E, Rehkämper M, Kreissig K, Coles B, Wu L, Luo Y, Christie P (2024) Cadmium and zinc isotope compositions indicate metal sources and retention mechanisms in different soil particle size fractions. J Hazard Mater 461: 132560. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132560>.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

2^{ème} partie : Impact des éléments traces métalliques sur la qualité du sol de la mine de Tamra : activités enzymatiques des sols

1. Introduction

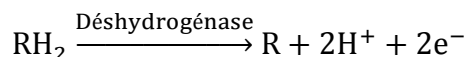
La présence des éléments traces métalliques (ETM) dans le sol, même à faible dose, peut affecter ses fonctions spécifiques telles que le cycle biogéochimique des nutriments, sa productivité ainsi que sa durabilité. Les niveaux de pollution peuvent être évalués à l'aide des indicateurs adéquats permettant de mesurer les conditions de perturbation (Lee *et al.*, 2020). Les activités enzymatiques sont des indicateurs de la santé du sol, révélant sa fertilité, sa fonctionnalité et par conséquent son état biologique (Lee *et al.*, 2020 ; Martínez-Toledo *et al.*, 2023). Elles sont considérées comme des indicateurs précieux de la qualité des sols en raison de leur sensibilité aux stress causés par les éléments toxiques, ainsi que de leur relation avec les réactions microbiennes et les cycles des nutriments (Aponte *et al.*, 2020a; Attademo *et al.*, 2021). Dans un contexte minier, souvent marqué par une dégradation importante du sol et de surcroît contaminé par des ETM, les activités enzymatiques constituent des indicateurs sensibles et précoces de la perturbation écologique. L'inhibition de ces activités fournit une mesure qualitative de la toxicité et des niveaux de contamination. Elles permettent ainsi de diagnostiquer l'état de santé du sol, de suivre l'impact de la pollution et d'évaluer l'efficacité des stratégies de réhabilitation mises en place. Cependant, les interactions entre les ETM, les caractéristiques du sol et les activités enzymatiques sont très complexes. Ainsi, plusieurs facteurs doivent être pris en compte lors de l'évaluation de la contamination et de la fonctionnalité des sols tels que le pH, la teneur en matière organique, et le taux d'argile (Martínez-Toledo *et al.*, 2023).

1.1. Déshydrogénase

La mesure de l'activité déshydrogénase (DH) d'un sol est un excellent outil pour évaluer l'impact des ETM sur la qualité du sol (Mambu, 2014). Cette activité est fréquemment utilisée comme indicateur de l'activité biologique dans les sols (Burns 1978). Sa détection dans un sol témoigne de la présence de microorganismes au métabolisme actif. Les déshydrogénases, en tant qu'enzymes intervenant dans la chaîne respiratoire, jouent un rôle essentiel dans la production d'énergie par les organismes. Ces enzymes permettent d'oxyder les composés

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

organiques en séparant deux atomes d'hydrogène selon la réaction suivante (Lenhard *et al.*, 1964) :



Les déshydrogénases jouent ainsi un rôle important dans l'oxydation biologique de la matière organique du sol en transmettant l'hydrogène de substances organiques à des accepteurs inorganiques (Bandyopadhyay & Maiti, 2021). Ces processus dépendent étroitement de la nature du sol et des relations entre l'air et l'eau. Dans le contexte minier, l'activité des déshydrogénases diminue avec l'augmentation des concentrations des éléments traces, en raison de la détérioration de la microflore et du manque de la matière organique dans le sol (Bandyopadhyay & Maiti, 2021 ; Kumar *et al.*, 2013). Cependant, certains sols parviennent à conserver, voire à augmenter cette activité sous l'effet de communautés microbiennes capables d'adopter des stratégies d'adaptation face aux ETM (Gong *et al.*, 2021).

1.2. β -glucosidase

La β -glucosidase est une enzyme prédominante dans les sols (Turner *et al.*, 2002). Elle joue un rôle majeur en catalysant l'hydrolyse de divers β -glucosides présents dans les résidus végétaux, favorisant ainsi leur décomposition et la libération de sucres simples assimilables par les micro-organismes. Ainsi, cette enzyme est nommée en fonction du type de liaison hydrolysée (Martinez & Tabatabai, 1997). Elle fait partie de la catégorie des glucosidases qui hydrolysent les disaccharides. Ces réactions produisent du glucose comme produit final. Ce dernier est une source de carbone (C) importante pour la croissance et l'activité des microorganismes du sol (Merino *et al.*, 2016). La β -glucosidase joue un rôle fondamental dans le cycle du carbone en facilitant la dégradation des glucides complexes. Ainsi, en raison de son intérêt dans la vitalité biologique du sol, elle a été désignée comme étant le meilleur indicateur de la santé de l'écosystème du sol (Chae *et al.*, 2017). Cependant, dans les sols miniers, la présence des ETM diminue considérablement le taux de β -glucosidase en raison de leur toxicité exercée sur les micro-organismes (Martínez-Toledo *et al.*, 2017). Cette inhibition empêche la dégradation de la matière organique, perturbant ainsi le cycle du carbone et, par conséquent, la fertilité du sol.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

1.3. Phosphatases

Les phosphatases sont un ensemble d'enzymes capables de catalyser l'hydrolyse des esters et des anhydrides de l'acide phosphorique (Amri *et al.*, 2022) jouant ainsi un rôle clé dans la libération du phosphore inorganique à partir de composés organiques. La flore et les microorganismes représentent les sources principales d'enzymes phosphatases dans le sol. En effet, le taux de phosphatase dans le sol varie en fonction du nombre de microbes, de la teneur en matières organiques et du type du sol (Margalef *et al.*, 2021).

Les plantes n'utilisent que du phosphore inorganique (P), alors qu'une grande quantité est liée à des éléments organiques. La minéralisation de cette fraction organique de P peut avoir une importance vitale pour la nutrition des plantes (Tian *et al.*, 2021). Le déficit de phosphore dans le sol entraîne une augmentation de la sécrétion de phosphatase par les racines des plantes et les microorganismes. Cette augmentation permet de renforcer la solubilisation et la remobilisation du phosphate (Wan *et al.*, 2020). Ainsi, la plante améliore sa capacité à résister aux conditions de stress liées au phosphore (Khan *et al.*, 2023). Cette constatation montre que les besoins des plantes et des microorganismes en phosphore peuvent être liés à l'activité des phosphatases du sol (Condrón *et al.*, 2005). Ces activités peuvent donc être considérées comme un indicateur de la disponibilité du phosphore inorganique pour les plantes et les microorganismes (Piotrowska-Dlugosz & Charzynski, 2015).

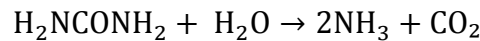
On distingue deux principaux types : i) les phosphatases acides (Pac) sont générées à la fois par les plantes et les microorganismes du sol, et ii) les phosphatases alcalines (Pal) qui sont uniquement produites par les microorganismes. Le pH du sol peut affecter le taux de synthèse, la libération ainsi que la stabilité des phosphatases (Acosta-Martinez & Tabatabai, 2000). Par exemple, l'augmentation du pH du sol entraîne une augmentation de l'activité de Pal et une diminution de l'activité de Pac. Ces activités permettent d'évaluer l'effet du pH sur la culture et de déterminer la quantité de calcaire nécessaire pour ajuster le pH à des niveaux optimaux (Dick *et al.*, 2000). Par conséquent, le rapport Pal/Pac peut être un meilleur moyen d'évaluer le pH effectif du sol et les besoins en chaux que les méthodes chimiques telles que la mesure du pH dans une solution aqueuse, la titration acido-basique, et l'analyse des concentrations échangeables de calcium (Acosta-Martinez *et al.*, 2003). Dans le contexte minier, la contamination des sols par les ETM affecte les activités Pal et Pac, entraînant une perturbation du cycle du phosphore et par conséquent la dégradation de leur qualité (Martínez-Toledo *et al.*,

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

2017). Ces contaminants peuvent également modifier les propriétés physicochimiques du sol en particulier le pH et affectent directement la microflore. En revanche, ces activités (Pac et Pal) dépendent fortement de plusieurs facteurs notamment le pH et la salinité du sol, les conditions climatiques, la couverture végétale et l'association mycorhizienne (Kumar *et al.*, 2011).

1.4. Uréase

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée en CO₂ et NH₃, avec un mécanisme réactionnel basé sur la formation de carbamate :



Cette réaction provoque une augmentation du pH du sol et une perte d'azote dans l'atmosphère *via* la volatilisation du NH₃ (Das & Varma, 2010 ; Adetunji *et al.*, 2017). L'uréase permet de catalyser également l'hydrolyse de l'hydroxyurée, de la dihydroxyurée et du semicarbazide, en utilisant le nickel comme cofacteur (Hopkins *et al.*, 1996). Elle est largement présente dans la nature ; elle provient des microorganismes, de déchets animaux, de plantes et d'algues (Follmer, 2008). Bien que l'urée puisse être produite de façon constitutionnelle dans certains organismes, elle est généralement régulée par le nickel (Machuca *et al.*, 2015). En effet, la production de l'uréase est inhibée lorsque les cellules microbiennes se développent en présence de NH₄⁺, source d'azote préférée (Geisseler *et al.*, 2010). Cependant, sa production est stimulée par la présence d'urée ou d'une autre source d'azote (Mobley *et al.*, 1995). L'uréase est considérée comme un bon indicateur de la qualité du sol, en raison de son rôle de régulation de l'apport d'azote aux plantes (Piotrowska-Dlugosz & Charzynski, 2015). Plusieurs facteurs peuvent influencer le niveau de production de cette enzyme tels que les habitudes culturelles, la matière organique, la profondeur du sol, les ETM, la température et le pH (Adetunji *et al.*, 2021). Globalement, la contamination des sols par les ETM engendre une réduction de cette activité en raison de leur effet toxique sur les microorganismes et les propriétés du sol. Ceci entraîne la perturbation du cycle de l'azote, affectant ainsi la fertilité des sols et l'écosystème. Cependant, Park *et al.* (2014) ont montré que certaines bactéries productrices d'uréase peuvent s'adapter à des conditions extrêmes, ce qui pourrait améliorer les procédés de bioremédiation. Cela souligne également la relation complexe entre la santé des sols et la résistance microbienne dans les milieux contaminés.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

1.5. Activités hydrolytiques (vis-à-vis du diacétate de fluorescéine)

Le diacétate de fluorescéine (FDA) permet de mesurer les activités hydrolytiques microbiennes des sols (Ma, 2010). Cette activité hydrolytique consiste en l'hydrolyse du FDA qui libère de la fluorescéine par les microorganismes du sol. Cette réaction est réalisée principalement par les lipases, les protéases et les estérases des microorganismes telluriques (Figure II.1).

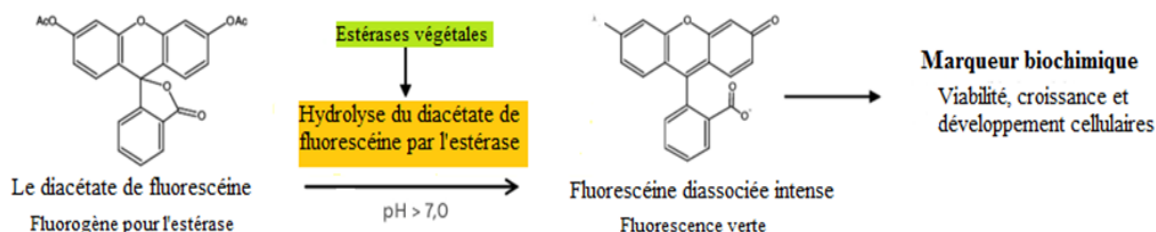


Figure II. 1. Production de la fluorescéine (Vitecek *et al.*, 2007).

La fluorescéine résultante peut être quantifiée par spectrophotométrie, offrant ainsi une mesure indirecte de l'activité microbienne dans le sol (Green *et al.*, 2006). Un lien entre l'augmentation de l'activité hydrolytique vis-à-vis de la FDA et le taux de carbone de la biomasse microbienne du sol a été établi (Ma, 2010). En outre, la FDA dépend largement des propriétés du sol, en particulier du taux d'argile, de la teneur en matière organique et du pH (pH optimal de 7,6) (Green *et al.*, 2006, Chakrabarti & Bhattacharyya, 2006). Elle constitue un bon indicateur de la santé et de la fertilité biologique du sol.

Comme ces enzymes sont des composés biodégradables naturels, extrêmement sensibles aux ETM, il est nécessaire de les étudier en tant qu'indicateurs de la dégradation du sol. Cependant, des études montrent que les sols contaminés constituent un système dynamique et multifactoriel dans lequel se produisent des interactions complexes entre les composants chimiques, biologiques et physiques (Tao *et al.*, 2022 ; Li *et al.*, 2022). Les activités de ces enzymes peuvent varier en fonction de la concentration en polluants, du type du sol et de l'enzyme elle-même. Par exemple, la déshydrogénase et la phosphatase acide sont plus sensibles à la contamination par le Cd, Pb et Zn que l'uréase (Nadgórska-Socha *et al.*, 2013). Des études ont montré également que les ETM réduisent l'activité de diverses enzymes, l'uréase étant la moins touchée (Minnikova *et al.*, 2022 ; 2024). Les impacts des ETM sur les activités enzymatiques dépendent aussi de la profondeur du sol, de sa teneur en argile et du type de métaux en cause (Aponte *et al.*, 2020b).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Dans la première section de ce chapitre, les résultats soulignent la nécessité de réhabiliter les sols miniers de Tamra afin de limiter l'impact environnemental des ETM. Ainsi, la réhabilitation durable des sites contaminés vise à la fois à réduire les coûts et à restaurer la santé du sol. Le suivi des contaminants, des métabolites ainsi que des fonctions du sol en amont et après la réhabilitation permet d'évaluer correctement son efficacité (Lee *et al.*, 2020).

Ce présent travail est consacré à l'étude d'activités enzymatiques, celles qui pourraient être utiles en tant qu'indicateur biologique des impacts anthropogéniques sur les sols de Tamra.

2. Matériel et méthodes

La méthode d'échantillonnage et les caractérisations physicochimiques des sols utilisés dans cette étude ont été initialement décrites dans l'article présenté dans la première partie de ce chapitre (II) intitulé " Assessment of Trace Element Soil Contamination and Environment Risks in Soils from Iron Mining areas".

Six activités enzymatiques ont été étudiées dans les sols collectés de la mine de Tamra : la déshydrogénase (DH), la β -glucosidase, la phosphatase acide (Pac), la phosphatase alcaline (Pal), l'uréase (Ure), et l'hydrolyse du diacétate de fluorescéine (FDA). Ces activités ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Allemagne) équipé du logiciel d'analyse de données MARS (version V5.02 R3).

2.1. Activité déshydrogénase

La déshydrogénase (DH) a été dosée en mélangeant 0,1 g de sol séché à température ambiante avec 200 μ l de la solution glucosée à 1 % et 80 μ l de solution de chlorure de 2,3,5 triphényltétrazolium (TTC) à 3 % (Casida *et al.*, 1964). Le mélange a été incubé sous agitation (150 tr/min) pendant une nuit à 25 °C, puis 2 ml de méthanol ont été ajoutés. La solution obtenue a été reposée pendant 4 heures à 25 °C. Après centrifugation, 200 μ l du surnageant ont été placés dans une microplaque. L'absorbance a été mesurée à 485 nm. L'activité de la déshydrogénase a été calculée à l'aide du coefficient $\epsilon = 15500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et exprimée en nmol produit par minute par gramme du sol.

2.2. β -glucosidase

La β -glucosidase (β -glu) a été mesurée en mélangeant 0,1 g de sol séché à température ambiante avec 400 μ l de tampon phosphate citrate à 0,15 M ajusté à un pH à 4 (Lebrun *et al.*, 2021). Cette

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

activité a été dosée en ajoutant 40 µl de la solution de 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (PNPG) à 10 mM. Les échantillons ont ensuite été incubés à 37°C sous agitation pendant 3 heures, puis centrifugés pendant 3 minutes à 14 000 x g. Après la centrifugation, 200 µl de surnageant ont été combinés à 200 µl de carbonate de sodium à 2 % dans un microtube pour stopper la réaction. Après homogénéisation de la solution résultante, 200 µl ont été déposés dans une microplaque pour la lecture à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Allemagne) équipé du logiciel d'analyse de données MARS (version V5.02 R3). La mesure de l'absorbance a été effectuée à 410 nm. Cette activité a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction de l'oNP ($18400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.3. Phosphatase acide (Pac) et phosphatase alcaline (Pal)

Les activités phosphatases ont été mesurées en utilisant le phosphate de 4-nitrophényle (PNPP) en tant que substrat. Deux grammes de sol sec ont été mélangés avec 2 ml de l'eau ultrapure et incubés pendant une nuit à 25°C. Le lendemain, 2 ml de tampon d'acétate de sodium (0,1 M, pH 5) ont été ajoutés pour le test de Pac et 2 ml de tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0) pour le test de Pal. Ces mélanges ont été agités pendant une nuit à 150 rpm et à température ambiante. Après centrifugation, 100 µl d'extrait protéique ont été combinés à 100 µl d'une solution de PNPP à 5 mM dans une microplaque. La microplaque a été ensuite incubée à 25 °C pendant une heure. À la fin de l'incubation, la réaction a été bloquée par l'ajout de 100 µl de NaOH à 0,1 M. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 410 nm (Garcia-Gil *et al.*, 2000 ; Lebrun *et al.*, 2021). Le calcul des activités des phosphatases a été effectué à l'aide du coefficient $\varepsilon = 19500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4. Uréase

L'uréase (Ure) a été mesurée en utilisant l'urée comme substrat de cette enzyme. Le sol (0,1 g) a été mélangé avec 3 ml de tampon acétate à 50 mM de pH 5. Après une agitation pendant une minute, 750 µl de la suspension ont été combinés à 750 µl de solution d'urée à 40 mM. Le mélange a été incubé pendant 4 h sous agitation à température ambiante. Ensuite, 200 µl de KCl à 1M ont été ajoutés puis l'ensemble mis à agiter pendant 30 minutes à 25°C. Après centrifugation (10000 rpm, 1 min), 40 µl de surnageant ont été combinés à 200 µl de solution de salicylate de sodium/NaOH et 80 µl d'isocyanure de sodium dans une microplaque. Une courbe d'étalonnage a été préparée à partir d'une série de dilutions de la solution mère de NH_4^+ .

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

N (71,43 mM) dans une plage à différentes concentrations (714, 357, 179, 89,3, 44,6, 22,3 et 0 nmol/ml) (Kandeler & Gerber, 1988 ; Allison, 2001). Le mélange a été reposé pendant 30 minutes avant la mesure de l'absorbance à 690 nm. L'activité a été calculée comme suit :

$$\text{Activité d'uréase} = \frac{[NH_4^+] \times V \times 100}{m_s \times t}$$

Avec : $[NH_4^+]$: concentration mesurée (mol. L⁻¹) ; V : volume de la suspension (μl) ; m_s : masse du sol (g) ; t : temps d'incubation (h).

2.5. Hydrolyse du diacétate de fluorescéine

L'hydrolyse du diacétate de fluorescéine (FDA) a été évaluée en mélangeant 0,1 g de sol séché à température ambiante avec 5 ml de tampon phosphate de potassium à 60 mM de pH 7,6 et 50 μl d'une solution de FDA à 50 mM (Schr & Rosswall, 1982 ; Lebrun *et al.*, 2021). Ce mélange a été ensuite incubé à 37°C sous agitation à 105 rpm pendant 4 h. Après la centrifugation, 200 μl de surnageant ont été déposés dans une microplaque. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 490 nm. L'activité d'hydrolyse du FDA a été calculée à l'aide du coefficient $\varepsilon = 8000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

2.6. Indices multienzymatiques

Afin d'évaluer la qualité biologique des sols miniers de Tamra, des indices multienzymatiques ont été calculés. La moyenne géométrique (MGea) est un indice global qui permet de regrouper les informations de variables qui possèdent des unités différentes et des variations d'échelle (Garcia-Ruiz *et al.*, 2008). La MGea a été calculée comme suit :

$$(\text{MGea}) = (\beta\text{glu} \times \text{Pac} \times \text{Pal} \times \text{DH} \times \text{Ure} \times \text{FDA})^{1/6}$$

L'indice d'altération trois (IA3) est un indicateur de synthèse des données qui associe et équilibre les activités de la β -glucosidase, des phosphatases (acide et alcaline) et de l'uréase (Puglisi *et al.*, 2006). Il permet d'établir un score reflétant le degré de changement, positif ou négatif, lié aux processus anthropogéniques (Trasar- Cepeda *et al.*, 2000). Cet indice a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{IA3} = 7,87 \beta\text{glu} - 8,22 (\text{Pac} + \text{Pal}) - 0,49 \text{Ure}$$

L'indicateur de pH enzymatique est le rapport Pal/ Pac, qui permet de déterminer rapidement et avec précision l'état de pH d'un sol. Cette approche peut également être appliquée à des sols

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

humides, séchés à l'air ou au champ, puisqu'il ne s'agit pas de valeurs absolues, mais de rapports de valeurs (Dick *et al.*, 2000). Elle peut être appliquée à une variété de sols présentant des propriétés différentes, telles que ceux de la mine de fer de Tamra.

2.7. Analyses statistiques

Les résultats de cette étude ont été analysés statistiquement. Les différences entre les sols ont été mesurées à l'aide du test ANOVA, la signification étant déterminée à $p < 0,05$ selon le test LSD. Les résultats ont été présentés sous la forme d'une valeur moyenne $\pm$ écart-type (ET).

Les relations entre les activités enzymatiques et les paramètres physicochimiques étudiés dans la première partie de ce chapitre ont été évaluées à l'aide d'une analyse de corrélation Pearson ($p < 0,05$). L'analyse des composantes principales (ACP) a été utilisée pour identifier la similarité des groupes entre les neuf points d'échantillonnage.

3. Résultats

Les activités enzymatiques mesurées sur les différents points d'échantillonnage des sols du site minier de Tamra présentent des variations notables selon leur position géographique : en amont (T₁, T₂ et T₃), au milieu (T₄, T₅ et T₆) et en aval (T₇, T₈ et T₉) de la mine de Tamra. (Figure II.3). De manière générale, l'intensité des activités enzymatiques suit l'ordre décroissant suivant : DH > Ure > β -glu > FDA > Pac > Pal. Parmi ces activités, celles de la déshydrogénase (DH, Figure II.3a), de la phosphatase acide (Pac, Figure II.3c) et de la phosphatase alcaline (Pal, Figure II.3d) atteignent leurs niveaux les plus élevés à l'extrême aval de la mine (T₉) ce qui pourrait être lié à une accumulation de matière organique et/ou à des conditions physicochimiques plus favorables à l'activité microbienne.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

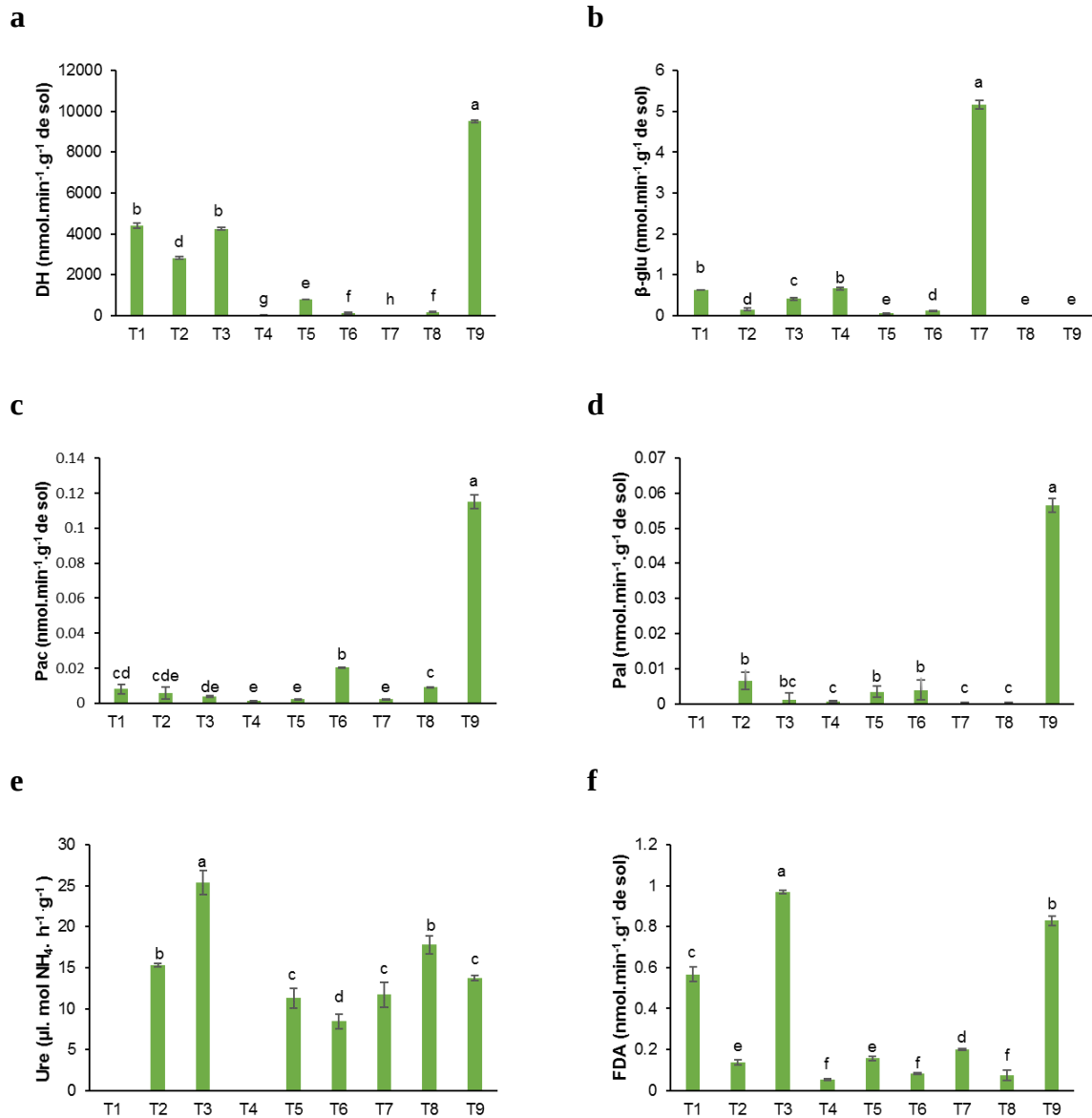


Figure II. 2. Activités enzymatiques de différents échantillons de sol : T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra, T4, T5 et T6 : au milieu de la mine de Tamra et T7, T8 et T9 : en aval de la mine de Tamra. **a)** déshydrogénase (DH), **b)** β-glucosidase (β-glu), **c)** phosphatase acide (Pac), **d)** phosphatase alcaline (Pal), **e)** uréase (Ure), et **f)** hydrolyse du diacétate de fluorescéine (FDA). Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les traitements ($n = 3 \pm$ l'écart type ; $p < 0,05$).

L'activité uréasique (Figure II.3e) est particulièrement marquée à T3 tout comme l'hydrolyse du diacétate de fluorescéine (Figure II.3f). Quant à la β-glucosidase, elle se distingue par une activité maximale à T7 (Figure II.3b), suggérant une meilleure dynamique de dégradation de la matière organique dans cette zone.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Cependant, les sols situés au milieu de la mine présentent les plus faibles niveaux d'activités enzymatiques, à l'exception de T4 pour la β -glucosidase et de T6 pour la phosphatase acide (figure II.3 b ; c) où une activité légèrement plus soutenue est observée. Cette diminution marquée au centre du site minier pourrait résulter d'une intensité de l'exploitation minière plus importante entraînant une dégradation plus sévère du sol, une réduction par conséquent de la biomasse microbienne et une altération au final des cycles biogéochimiques.

Des études similaires soutiennent ces hypothèses car elles ont montré que ces activités enzymatiques sont significativement plus faibles dans les sols affectés par l'exploitation minière (Xu *et al.*, 2020 ; Sun *et al.*, 2020), traduisant une perte de fertilité et un affaiblissement de la résilience écologique du milieu.

De manière générale, la fonctionnalité des activités enzymatiques dans les sols est étroitement liée à plusieurs paramètres environnementaux, notamment les propriétés physicochimiques du sol et les concentrations biodisponibles en éléments traces (Martínez-Toledo *et al.*, 2023).

Pour mieux comprendre ces interactions complexes, une analyse de corrélation de Pearson a été réalisée sur l'ensemble des données.

Comme le montre le tableau II.1, une corrélation fortement positive existe entre l'activité DH et la teneur en matière organique avec $R = 0,76$ ($p < 0,05$), ce qui souligne l'importance de la MO comme source d'énergie et de substrats pour les microorganismes producteurs d'enzymes. De même, des corrélations positives bien que modérées sont enregistrées entre l'activité Ure ($R=0,45$), celle mesurée par l'hydrolyse du FDA ($R=0,35$) et la MO. À nouveau ces résultats s'expliquent par le fait que la MO l'activité microbienne et donc la production d'enzymes, ce qui corrobore les travaux de Khatoon *et al.*, (2017). Cependant, des corrélations négatives existent entre les activités β -glu, Pac, Pal et la MO. Ceci pourrait être lié à la présence combinée des éléments traces (Fe, Mn, Zn, Pb, Cd et As) dans le sol minier de Tamra, pouvant exercer une toxicité avec un impact inhibiteur synergique ou additif sur certaines enzymes, contribuant à ces corrélations négatives observées avec la MO (Roy *et al.*, 2004).

Le pH du sol, un facteur déterminant dans l'activité enzymatique, montre quant à lui des corrélations négatives de modérées à faibles avec les activités DH, Pal, Ure, FDA et le pH avec des R de -0,54, -0,63, -0,39 et -0,10 respectivement.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Tableau II. 1. Corrélation de Pearson entre les activités enzymatiques, les concentrations biodisponibles des éléments traces, la teneur en matière organique, le pH et la teneur en argile ($p < 0,05$).

	DH	β -glu	FDA	Pac	Pal	Ure	Fe	Mn	Zn	Pb	Cd	As	pH	MO
β-glu	-0,3512													
FDA	0,4802	-0,0452												
Pac	-0,0762	-0,3081	-0,2238											
Pal	-0,0697	-0,471	-0,1688	0,3192										
Ure	0,3104	0,0087	0,8367	-0,1247	0,2963									
Fe	0,6691	-0,2164	-0,2959	0,0693	0,1188	-0,2826								
Mn	0,2065	-0,1985	-0,2045	-0,0586	0,8007	0,2254	0,5174							
Zn	<u>0,4786</u>	-0,188	0,1174	-0,2802	0,6289	0,4415	0,5336	0,9208						
Pb	-0,206	0,2876	-0,3226	-0,2734	0,533	0,0849	0,2365	0,812	0,6775					
Cd	<u>0,4328</u>	-0,2431	-0,2232	-0,0006	0,624	0,0706	0,7722	0,9304	0,8795	0,6999				
As	0,2864	-0,25	-0,0007	0,0391	0,8186	0,3992	0,4521	0,9604	0,9106	0,7467	0,9039			
pH	-0,5448	<u>0,4081</u>	-0,1026	0,2691	-0,6314	-0,3915	-0,5291	-0,8426	-0,9477	-0,4727	-0,7981	-0,8085		
MO	0,7684	-0,3924	0,5459	-0,3831	-0,0015	0,3453	0,4188	0,2728	0,5258	0,0525	0,4375	0,3872	-0,5325	
Argile	-0,3506	0,5138	0,384	-0,5972	0,082	0,5905	-0,5788	0,1426	0,2375	0,4613	-0,1263	0,1609	-0,1036	-0,0251

Déshydrogénase (DH), β -glucosidase (β -glu), phosphatase acide (Pac), phosphatase alcaline (Pal), uréase (Ure), et hydrolyse du diacétate de fluorescéine (FDA).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Ces résultats suggèrent que les variations de pH peuvent entraîner des changements ioniques et donc structuraux au niveau du site actif des enzymes, affectant ainsi leur fonctionnalité (Frankenberger & Johanson, 1982). En revanche, des corrélations positives, de modérées à faibles, sont également enregistrées entre les activités β -glu, Pac et le pH. Ce qui indique qu'une augmentation du pH du sol peut renforcer l'activité de ces deux enzymes. Ces résultats soulignent que les différentes enzymes ont une réaction particulière aux changements de pH, ce qui reflète leurs optima de pH spécifiques (Wade *et al.*, 2021).

La teneur en argile, est l'un des facteurs les plus importants dans la stabilisation et la protection des activités enzymatiques, en particulier dans les sols contaminés par les ETM (Naidja *et al.*, 2000). Les résultats obtenus montrent des corrélations positives, modérées et faibles entre la teneur en argile et les activités Ure ($R=0,59$), β -glu ($R=0,51$), FDA ($R=0,38$) et Pal ($R=0,08$). Alors que, des corrélations négatives modérées existent entre DH, Pac et la teneur en l'argile avec R égale à $-0,39$ et $-0,59$ respectivement, ce qui corrobore les travaux de Rao *et al.* (2000), qui ont constaté que la réduction de l'activité de déshydrogénases et de phosphatases acides avec l'augmentation de la teneur en argile.

Les éléments traces métalliques peuvent également fortement influencer les activités enzymatiques du sol. Les résultats montrent des corrélations positives de modérées à fortes entre la phosphatase alcaline et tous les éléments traces étudiés (Fe, Zn, Mn, Cd, Pb et As), suggérant que, dans certains contextes, ces éléments peuvent activer ou stabiliser cette enzyme. Ces résultats confirment les observations de Wiatrowska *et al.* (2015), de Kouchou *et al.* (2017) et d'Aziza *et al.* (2020) qui ont également montré des corrélations positives entre la Pal et les éléments traces. De même, des corrélations positives sont observées entre la déshydrogénase et tous les éléments étudiés, à l'exception du Pb, ce qui laisse penser à une certaine tolérance enzymatique vis-à-vis de certains métaux. En revanche, de faibles corrélations négatives sont enregistrées entre la plupart des éléments traces et les activités β -glu et FDA ($R < -0,35$), à l'exception du Pb et du Zn, respectivement. La phosphatase acide, quant à elle, présente des faibles corrélations négatives avec les ETM étudiés, à l'exception de Fe ($R=0,06$) et As ($R=0,03$) (tableau II.1).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Ces données soulignent les effets variables et parfois contradictoires des ETM sur les enzymes, ce qui reflète la complexité des interactions sol-enzyme-métal.

Bien que plusieurs études aient établi également des liens positifs entre la présence des ETM dans le sol et les activités enzymatiques (Kouchou *et al.*, 2017 et Aziza *et al.*, 2020), d'autres études rapportent des effets plus nuancés, mettant en évidence la sensibilité variable des enzymes à la toxicité des ETM (Aziza *et al.*, 2020 ; Yang *et al.*, 2016).

Afin de mieux comprendre les relations entre les différentes variables mesurées et de classer les paramètres étudiés, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée. Sur cette base, deux composantes principales ont été identifiées (F1 et F2) qui expliquent 64,88 % de la variation totale de la variance (Figure II.3).

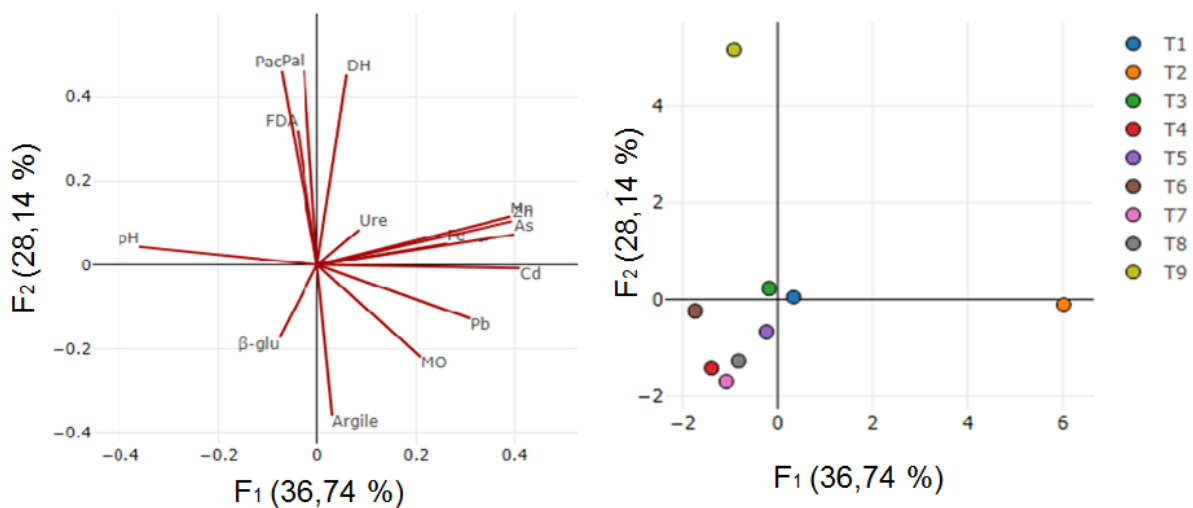


Figure II. 3. Analyse en composantes principales (ACP) des données de concentrations biodisponibles des éléments traces dans les sols miniers de Tamra : Fer (Fe), zinc (Zn), plomb (Pb), manganèse (Mn), cadmium (Cd), arsenic (As); des activités enzymatiques : déshydrogénase (DH), β-glucosidase (β-glu), phosphatase acide (Pac), phosphatase alcaline (Pal), uréase (Ure), et hydrolyse du diacétate de fluorescéine (FDA) et de la teneur en matière organique, du pH, et de la teneur en argile.

La composante 1 (F1) est responsable de 36,74 % de tous les éléments de la composante variable et est fortement corrélée avec pH, Fe, Mn, Zn, As, Cd, Pb, MO et Ure. La composante 2 (F2), qui explique 28,14 % de la variance globale, est liée à la teneur en argile, Pac, Pal, FDA, DH, β-glu. La longueur des vecteurs dans le diagramme indique le degré de contribution de chaque variable à composante correspondante.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

L'analyse de la distribution spatiale des échantillons (T1 à T9) dans l'espace factoriel révèle que T9 se distingue par des valeurs élevées en Pac, Pal et DH, tandis que T7 se caractérise par une forte activité β -glucosidase ; T3, quant à lui, se singularise par des niveaux élevés d'uréase et de FDA, alors que T2 présente les concentrations biodisponibles en ETM les plus importantes. Ces observations confirment que les interactions entre les activités enzymatiques, les caractéristiques physico-chimiques du sol et la présence des éléments traces sont complexes et spécifiques à chaque enzyme, dépendant fortement des conditions locales du sol.

La qualité biologique des sols miniers de Tamra a été évaluée en s'établissant sur les principales activités enzymatiques en raison de leur rôle dans les processus biochimiques du sol et de leur sensibilité aux ETM. Ainsi, divers indices biologiques ont été calculés. La moyenne géométrique (MGea) est un indicateur biologique sensible qui permet de détecter rapidement la qualité du sol. La figure II.4a montre que la MGea est très faible pour la plupart des échantillons (MGea = 0), ce qui s'explique par la pollution minière (Li *et al.*, 2022). Ce résultat suggère la faiblesse de l'activité microbienne et la limitation des fonctions écologiques du sol minier de Tamra. Cependant, le sol T₃ présente la plus forte MGea, ceci pourrait être dû à sa faible concentration biodisponible des ETM étudiés (§2.1).

L'indice d'altération trois (IA3) représente une méthode de calcul utile pour interpréter l'activité enzymatique du sol, en particulier pour la β -glucosidase, la phosphatase et l'uréase. Cet indice permet de quantifier les changements d'état d'altération entre les sols (Van *et al.*, 2020).

Le résultat montre des scores AI3 variables, avec des valeurs négatives pour la plupart des échantillons (T2, T3, T5, T6, T8 et T9). Ceci indique que ces sols sont plus altérés, ils ont subi un plus grand degré de dégradation (Figure II.4b). Cette altération pourrait influencer l'équilibre des fonctions enzymatiques, indiquant des perturbations potentielles des processus microbiens du sol (Huyssteen *et al.*, 2020). En revanche, les sols T₇, T₄ et T₁ présentent des scores positifs élevés, indiquant des sols plus perturbés et traduisant le déséquilibre entre les activités enzymatiques (Figure II.4b). Ce déséquilibre traduit donc le dysfonctionnement du système biologique du sol minier de Tamra, dont la réponse enzymatique est perturbée. Ceci pourrait être dû à l'activité de l'uréase élevée.

L'indicateur de pH enzymatique permet d'estimer le pH le plus favorable à l'activité des microorganismes qui produisent les enzymes (Dick *et al.*, 2000). Le rapport (Pal/Pac) est faible pour la majorité des échantillons (<1, Figure II.4c). Ceci indique que les conditions de pH du

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

sol sont plus favorables à la production de la phosphatase acide (Dick *et al.*, 2000). En revanche, pour les échantillons T₂ et T₅, ce rapport est plus élevé (>1), ce qui indique que les conditions de pH du sol sont plus favorables à la production de la phosphatase alcaline. Ces observations mettent en évidence la libération de phosphore organique dans ces sols, favorisant ainsi sa biodisponibilité.

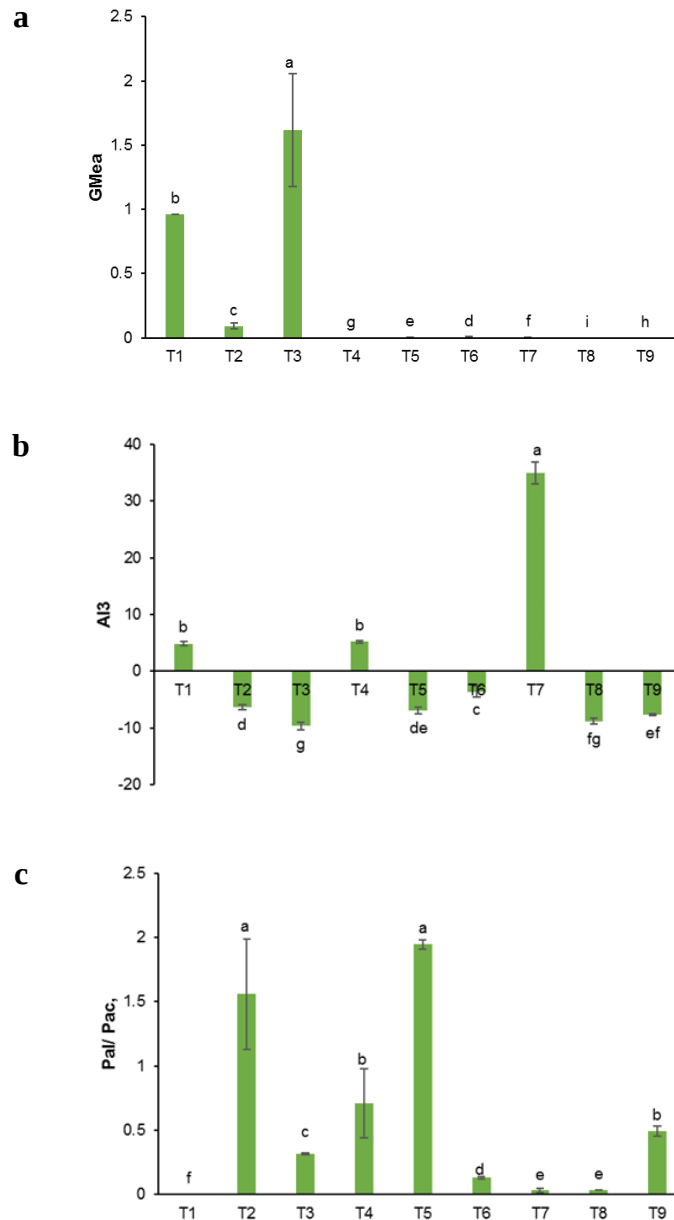


Figure II. 4. Indices de qualité des différents échantillons de sol : T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra ; T4, T5 et T6 : au milieu de la mine de Tamra ; et T7, T8 et T9 : en aval de la mine de Tamra : **a)** moyenne géométrique (MGea), **b)** indice d'altération trois (IA3), **c)** indicateur de pH enzymatique (Pal/Pac). Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les traitements ($n = 3 \pm$ écart type ; $p < 0,05$).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

4. Conclusion et perspectives

Les activités enzymatiques du sol se révèlent être des indicateurs sensibles et intégrateurs de la qualité des sols, en particulier dans les contextes perturbés comme les environnements miniers, même si les relations peuvent varier selon les enzymes spécifiques et les conditions du sol. Les résultats obtenus sur le site de la mine de Tamra mettent en évidence une forte hétérogénéité spatiale des activités enzymatiques, témoignant d'un écosystème pédologique affecté de manière différenciée selon les zones (amont, centre et aval). Cette variabilité reflète à la fois la diversité des pressions environnementales, et les capacités différentielles d'adaptation des communautés microbiennes.

Les interactions complexes observées entre les activités enzymatiques, le pH, la teneur en matière organique et en argile et la biodisponibilité des ETM soulignent l'impossibilité d'établir des modèles simples ou universels de réponse enzymatique. Ces interactions multifactorielles traduisent les effets conjugués de la toxicité due aux métaux présents, de la disponibilité des substrats et des conditions présentes sur le fonctionnement biologique des sols.

Le calcul de la moyenne géométrique (MGea) a permis de dresser un diagnostic global, révélant une faible activité enzymatique, indicatif d'un stress écologique significatif. Par ailleurs, l'indice d'altération trois (AI3) indique que les sols T₁, T₄ et T₇ sont particulièrement altérés, suggérant des déséquilibres dans les activités enzymatiques en ces sites. Le faible rapport Pal/Pac observé dans la majorité des échantillons indique une adaptation des communautés microbiennes du sol à des conditions acides. Ce déséquilibre peut altérer la disponibilité de certains éléments nutritifs, perturber les cycles géochimiques et réduire la résilience écologique des sols.

Globalement, le degré d'acidité élevé du site minier de Tamra, associé à une faible activité enzymatique et à des sols fortement altérés, témoigne au final d'un écosystème pédologique gravement perturbé par les ETM présents. Face à cette situation, plusieurs pistes de recherche et d'action méritent ainsi d'être envisagées :

- (1) Développer des stratégies de remédiation dites éco-compatibles faisant appel à des amendements organiques (comme le biochar) et à des plantes tolérantes aux ETM afin de restaurer-recouvrer la biomasse microbienne et d'améliorer en conséquence les activités enzymatiques ;

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- (2) Intégrer des indicateurs fonctionnels dans un programme de surveillance du site ; certaines activités enzymatiques pourraient être utilisées comme outil de suivi à long terme de l'efficacité des mesures de remédiation mises en œuvre et de la dynamique de la restauration écologique ;
- (3) Approfondir les mécanismes microbiens en envisageant des analyses métagénomiques et métatranscriptomiques pour mieux comprendre les réponses adaptatives des communautés microbiennes face à la pression des ETM ouvrant ainsi la voie à des approches de remédiation plus ciblées ;
- (4) Mettre en place des approches interdisciplinaires pour la gestion du site en combinant les données biologiques, géochimiques et hydrogéologiques dans une approche intégrée pour élaborer des plans de gestion durable ;
- (5) Prévoir d'étendre géographiquement et temporellement l'étude en réalisant des campagnes d'échantillonnage à d'autres zones de la mine, à différentes profondeurs et au fil des saisons afin de mieux caractériser l'évolution spatiotemporelle de la perturbation.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

3^{ème} partie : Distribution verticale des éléments traces métalliques dans le sol de Tamra

1. Introduction

Dans les environnements miniers, la mobilité et la spéciation des éléments traces métalliques (ETM) résultent de processus géochimiques complexes, eux-mêmes influencés à la fois par les activités anthropiques et les caractéristiques naturelles des sols (Zhang & Wang, 2020). Plusieurs études ont souligné la répartition et la biodisponibilité des éléments toxiques tels que le Cd, le Pb et l'As dans les sols miniers (Xie *et al.*, 2023; Rouhani *et al.*, 2025). L'analyse de la spéciation montre que ces éléments se présentent sous diverses formes chimiques, lesquelles conditionnent leur mobilité et déterminent leur risque écologique potentiel. Toutefois, certains éléments traces tels que le Zn, le Pb et le Cd peuvent être partiellement solubles dans les milieux miniers à cause de leur caractère cationique qui les rendent plus facilement mobiles (Elmayel *et al.*, 2020). Cette mobilité accrue contribue à renforcer les risques environnementaux et sanitaires pour les populations locales, en augmentant leur exposition à ces contaminants. Bien que la spéciation latérale des ETM et les risques associés soient désormais bien documentés, les études combinant la distribution et la spéciation latérale et verticale de ces polluants dans les sols contaminés restent limitées, en particulier dans les sites miniers, encore en exploitation en Tunisie. Il est donc particulièrement important de combler cette lacune afin d'évaluer les risques liés à la migration et à l'accumulation des ETM dans les différentes couches du sol ainsi que leur transfert vers les milieux aquatiques.

Dans ce contexte, le site minier de Tamra qui présente plusieurs sources d'eau, constitue un terrain d'étude privilégié pour analyser les processus de migration des ETM, afin d'évaluer les risques potentiels de ces éléments. Les interactions complexes entre les eaux de surface, les nappes phréatiques et les ETM présents dans le sol nécessitent une compréhension approfondie des processus verticaux de transport et d'accumulation de ces polluants. La présente étude s'inscrit dans la continuité de travaux présentés dans la section précédente de ce chapitre (§ 2.1), qui ont montré la nécessité d'interventions de dépollution et la mise en place de dispositifs de surveillance environnementale pour limiter les niveaux de contamination du site minier de Tamra. Contrairement à l'approche latérale adoptée, centrée sur les variations horizontales des ETM examinés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As), la présente étude vise à approfondir la compréhension de leur potentiel de migration vers les horizons plus profonds afin d'évaluer les risques associés. L'étude s'est focalisée sur l'analyse de la distribution verticale des ETM, leur

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

risque à se propager dans les eaux souterraines et à contaminer les nappes phréatiques profondes de la zone d'étude. Elle vise également à améliorer l'évaluation des risques environnementaux en fournissant une base de données intégrée sur la distribution et la spéciation des ETM pour la gestion durable et la protection des ressources en eau du site minier de Tamra. Notre choix s'est porté sur un profil pédologique, sélectionné pour sa représentativité géomorphologique et son intégrité non altérée par les activités minières.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient de :

- Évaluer la spéciation et la biodisponibilité des éléments traces (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans les sols du profil vertical réalisé ;
- Déterminer la distribution verticale des ETM dans les profils de sol
- Identifier les principaux facteurs qui influencent la distribution verticale de ces éléments traces ;
- Quantifier les risques environnementaux associés à la distribution verticale des éléments traces métalliques étudiés.

Ainsi, deux hypothèses ont été formulées :

- (1) Les éléments examinés migrent vers les couches plus profondes ce qui représente des risques sur la qualité de l'eau souterraine et les écosystèmes aquatiques ;
- (2) Il existe une hétérogénéité dans les propriétés physico-chimiques du sol influençant la distribution des ETM dans les différents horizons de ce profil.

2. Matériel et méthodes

Dans cette étude, les protocoles expérimentaux et les méthodes de calcul reprennent ceux détaillés dans (§ 2.1). Ces protocoles incluent : (1) les mesures physico-chimiques du sol à l'exception de la surface spécifique (Ss), (2) l'extraction séquentielle selon la méthode de Bureau de Référence de la Communauté européenne (BCR) et (3) la quantification de la pollution et l'évaluation des risques : facteur de contamination (FC), facteur d'enrichissement (FE), code d'évaluation des risques (CAR), indice de géoaccumulation, facteur de risque environnemental (FRE) et indice de charge polluante (ICP). La méthode d'échantillonnage et la spécificité du profil pédologique sont présentées ci-dessous.

Une coupe verticale (37° 03' 35.0" N, 9° 06' 10.22" E) à une profondeur totale de 734 cm a été réalisée dans la mine de Tamra le 22 mars 2022. Au moment de l'étude, le climat local est

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

tempéré, avec une température moyenne de 15°C. Cette coupe est située dans une zone topographiquement accidentée, structurée autour d'une colline à pente marquée. D'après les données GPS, l'altitude du site est de 196 m. Ce profil pédologique est établi sur une pente orientée nord-est affichant un pendage faible de l'ordre de 15°. Cette zone n'a pas été affectée par les opérations minières, et elle représente un témoignage des conditions pédogéochimiques naturelles du site d'étude. Leurs horizons présentent des colorations bariolées, signe de conditions d'oxydoréduction changeantes, probablement liées à des phénomènes d'hydromorphie (Figure II.5). La couverture végétale superficielle est composée notamment de *Lawsonia inermis* L., *Phyllanthus tenellus* Roxb, *Crissa spinarum* L., et *Phyllyrea latifolia* L.) participant possiblement à la stabilisation du sol et à l'apport de la matière organique.

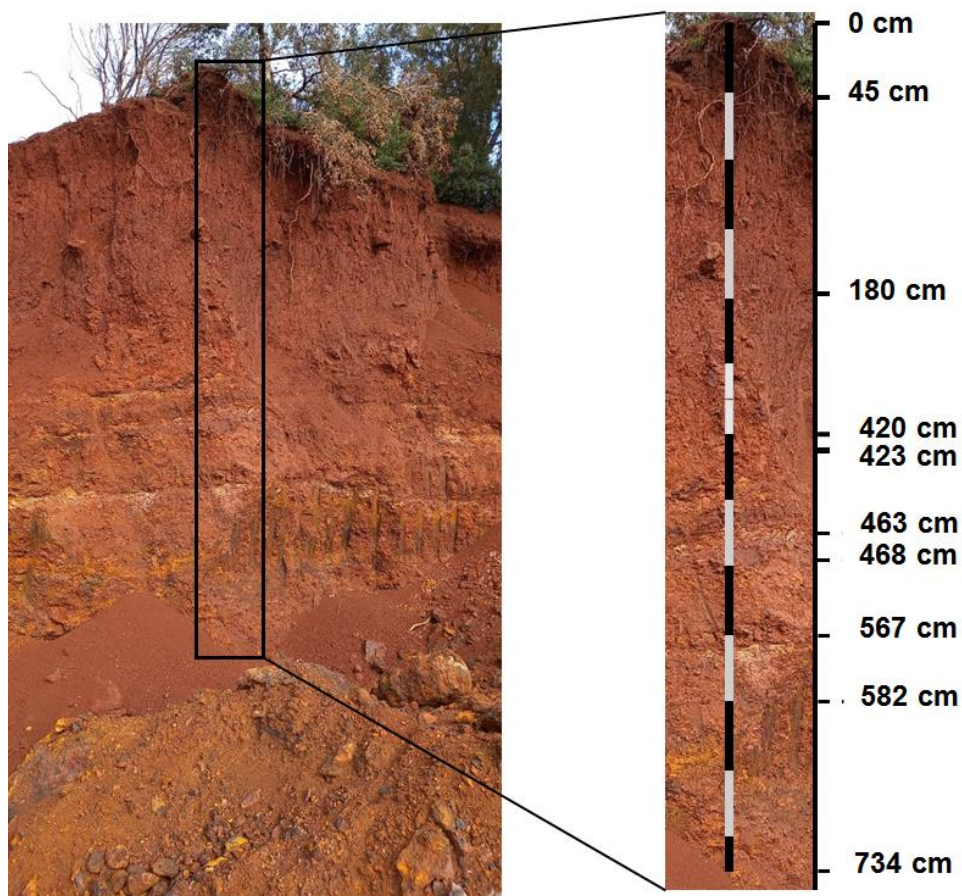


Figure II. 5. Profil pédologique du site minier de Tamra à une profondeur totale de 734 cm.

Les échantillons du sol ont été collectés en suivant les horizons pédogénétiques, du bas vers le haut du profil. Neuf échantillons au total ont ainsi été collectés, en suivant les limitations morphologiques de chaque horizon, à raison d'environ 1 kg par horizon. Ces prélèvements ont

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

permis de déterminer les caractérisations physico-chimiques et de réaliser l'extraction séquentielle des ETM dans chaque horizon.

Parmi les paramètres mesurés, la surface spécifique (S_s , $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$), facteur clé qui influence directement le comportement des ETM dans le sol, a été mesurée selon la méthode de Santamarina *et al.* (2002). Dix grammes de chaque échantillon ont été mélangés à 30 ml d'eau déminéralisée. Une solution de bleu de méthylène (5 g/l) a été ajoutée ensuite à cette suspension de sol par incréments de 0,5 ml. Après une agitation d'une minute, une petite goutte de la suspension a été prélevée et placée sur du papier filtre. Le bleu de méthylène a ainsi remplacé les cations de la double couche et couvert toutes les surfaces minérales. La surface spécifique de chaque échantillon a été déterminée en fonction de la quantité totale de colorant nécessaire pour atteindre le point de saturation, marqué par l'apparition d'une auréole de couleur bleu clair. S_s a été déterminée selon la formule suivante :

$$S_s (\text{m}^2.\text{g}^{-1}) = \frac{1}{319,89} \times \frac{1}{200} (0,5 N) A_v \times AMB \frac{1}{10}$$

Avec : N : le nombre d'incrément de bleu de méthylène (MB) ajoutés à la solution de suspension du sol ; A_v : le nombre d'Avogadro ; et AMB : la surface couverte par une molécule de bleu de méthylène.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisations physico-chimiques du profil pédologique

Les propriétés physico-chimiques du sol varient selon les horizons du profil pédologique (Figure II.6). Ainsi le pH varie entre 4,77 et 6,70, ce qui indique une nature allant de fortement acide à neutre (Figure II.6a). Selon la classification USDA Natural Resources Conservation Service (1998), les valeurs de pH mesurées se répartissent comme suit : très fortement acide ($4,5 < \text{pH} < 5,0$), fortement acide ($5,1 < \text{pH} < 5,5$), modérément acide ($5,6 < \text{pH} < 6,0$), légèrement acide ($6,1 < \text{pH} < 6,5$) et neutre ($6,6 < \text{pH} < 7,3$). La distribution verticale du pH du sol du profil pédologique suggère une stratification chimique naturelle possiblement due à des processus pédogénétiques comme le lessivage et l'altération (Maharana & Patel, 2013) ou à l'hétérogénéité du matériau parental dans ce contexte minier (Martínez-Toledo *et al.*, 2017). La conductivité électrique (CE) diminue avec la profondeur (Figure II.6b). Ces valeurs varient entre 8,79 et 22,25 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La valeur la plus élevée a été enregistrée pour le premier horizon (0

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

- 45 cm). Selon la classification FAO (USDA), tous les horizons sont considérés comme non salins (Rhoades *et al.*, 1999).

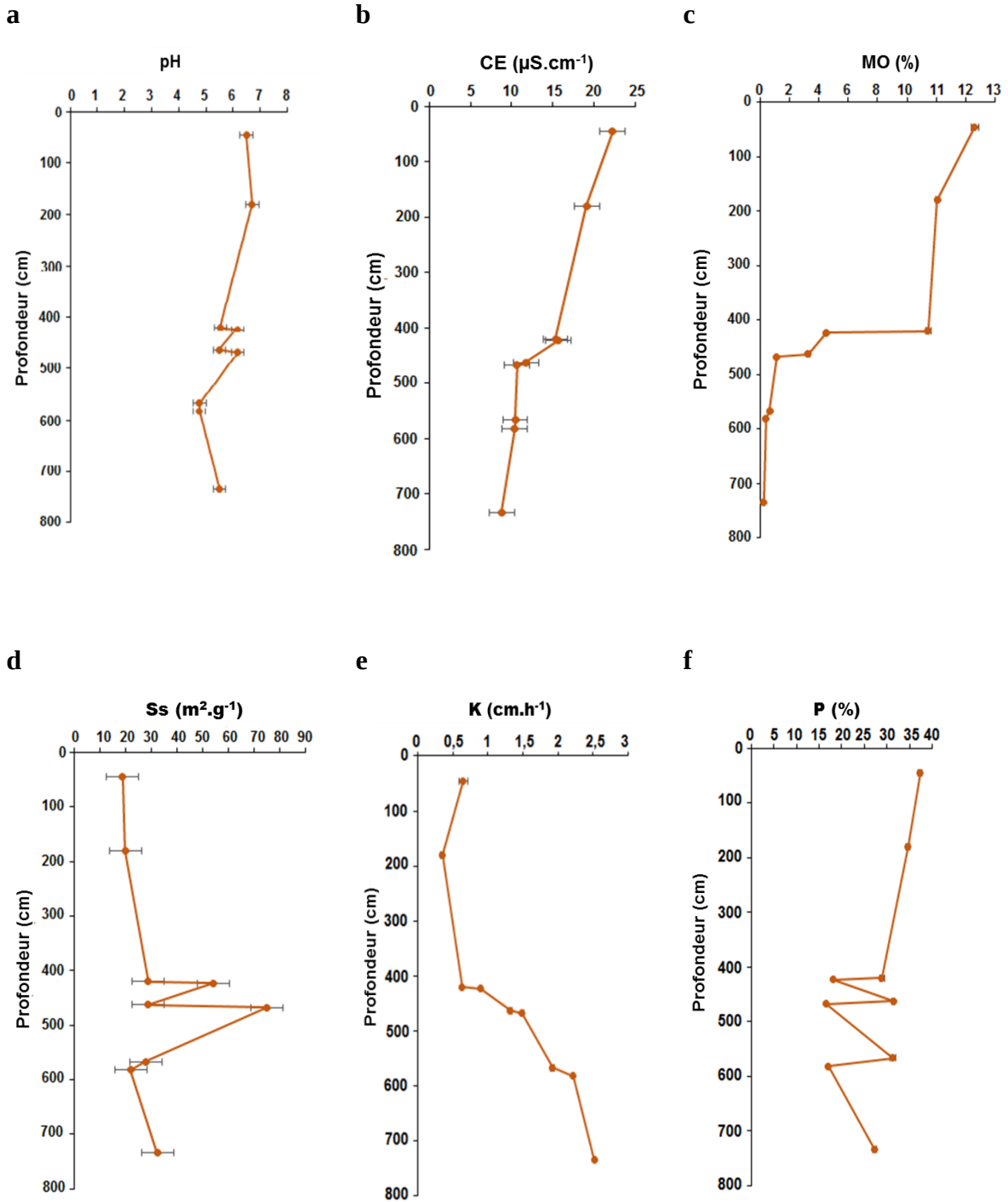


Figure II. 6. Caractérisations physico-chimiques du profil pédologique des 9 horizons : **a)** pH (H_2O) ; **b)** conductivité électrique (CE, $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) ; **c)** teneur en matière organique (MO, %) ; **d)** surface spécifique (Ss, $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ; **e)** perméabilité (K, $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$) ; **f)** porosité (P, %). Les résultats sont exprimés en moyenne ($n = 3$) $\pm$ l'écart type ; $p < 0,05$.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

La CE diminue généralement avec la profondeur du sol en raison du lessivage des sels solubles, de la diminution de la matière organique et de l'activité microbienne, principales sources d'ions en surface. En effet, les teneurs en matière organique varient significativement d'un horizon à l'autre entre 0,23 % et 14,62 % (Figure II.6c). Les teneurs les plus élevées ($3\% < MO < 15\%$) ont été enregistrées dans les premiers horizons jusqu'à 463 cm de profondeur. Ils sont considérés comme des sols minéraux riches en matière organique (Huang *et al.*, 2009). Dans l'ensemble, la teneur en MO diminue en fonction de la profondeur du profil. Cela pourrait être attribué à la baisse des apports biologiques, activité microbienne réduite et à des conditions physico-chimiques moins favorables qui limitent la décomposition et la formation de la MO en profondeur (Piotrowska-Długosz *et al.*, 2021).

La surface spécifique (Ss) du sol est l'un des principaux facteurs qui contrôle la mobilité et la rétention des polluants et des nutriments. Elle est étroitement liée à la teneur en argiles et en minéraux colloïdaux, et peut être estimée à travers la capacité du sol à adsorber le bleu de méthylène (Yukselen & Kaya, 2008). La Ss varie d'un horizon à l'autre de $18,81 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ à $75,08 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (Figure II.7d). La valeur la plus élevée a été enregistrée à une profondeur de 468 cm. Ceci peut être attribué à la présence de forte teneur en argiles. Cet horizon peut être considéré comme une couche à forte capacité de rétention des éléments traces étudiés dans ce profil pédologique. La variation de Ss dans l'ensemble du profil pourrait être liée à la distribution de la fraction fine du sol ainsi qu'à la teneur en matière organique (Niskanen & Mäntylähti, 1987) ou de la composition minéralogique argileuse (Arthur *et al.*, 2023), deux composantes influençant directement les capacités d'adsorption du sol.

La perméabilité (K) fait référence à la capacité d'un sol à laisser circuler des fluides à travers ses pores et par conséquent, elle contrôle la mobilité des éléments traces dissous (Carrillo-González *et al.*, 2006). Les valeurs de la perméabilité varient considérablement de 0,35 à 2,52 $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figure II.7e). Elle tend à augmenter avec la profondeur du profil, ceci pourrait s'expliquer par la nature perturbée et anthropisée du site minier de Tamra. En effet, les activités minières génèrent des mouvements de terrain qui entraînent des vides, des fractures et des zones de réorganisation des matériaux d'origine, augmentant ainsi la perméabilité des couches profondes (Khanal *et al.*, 2019). Selon la classification de la FAO, les premiers horizons jusqu'à une profondeur de 567 cm sont jugés comme ayant une perméabilité modérément faible ($0,5 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1} \leq K \leq 2 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$), sauf à 180 cm où la perméabilité est particulièrement faible ($K =$

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

0,35 cm.h⁻¹). Ces résultats indiquent la limitation de l'infiltration rapide de l'eau, qui pourrait être attribuée à la texture fine du sol ou à la teneur modérée en matière organique. Cependant, la couche de 180 cm de profondeur ($K = 0,34 \text{ cm.h}^{-1}$) peut agir comme une barrière hydrodynamique, entraînant un ralentissement du drainage vertical et, par conséquent, un piégeage géochimique des polluants (Orisakwe *et al.*, 2022). En dehors de ces couches, les valeurs de K dépassent 2 cm.h^{-1} , et sont considérées comme ayant une perméabilité modérée ($2 \text{ cm.h}^{-1} \leq K \leq 6,3 \text{ cm.h}^{-1}$). Cette augmentation pourrait entraîner des risques accrus de transport des éléments traces vers la nappe phréatique, favorisant ainsi la contamination des ressources en eau souterraine et posant des enjeux majeurs pour la qualité environnementale et la santé publique.

La porosité (P), un autre paramètre important qui contrôle la migration des ETM en profondeur, qui est définie comme étant le pourcentage du volume des vides entre les particules du sol. La structure des espaces poreux peut affecter la dynamique de l'eau et des ETM, ce qui influence à la fois la qualité du sol et de l'eau (Azizoltani *et al.*, 2019). La porosité présente une variation significative d'un horizon à l'autre, elle oscille entre 16,7 % et 37,3 % (Figure II.7f). La valeur la plus élevée a été enregistrée dans l'horizon superficiel du profil, ce qui peut être attribué à sa richesse en MO qui favorise la formation d'agrégats poreux qui améliorent la structure du sol (Rabbi *et al.*, 2020). A l'inverse, la valeur la plus faible a été observée à une profondeur de 468 cm, ce qui pourrait constituer une barrière partielle empêchant la mobilité verticale des ETM (de Campos *et al.*, 2020). Le site est en exploitation et il est récemment perturbé par l'activité minière, ce qui explique en grande partie l'inversion de la porosité plus forte en surface où le milieu remanié, aéré, parfois enrichi en MO et plus faible en profondeur où les matériaux sont compactés et peu structurés.

La granulométrie est un paramètre fondamental dans la spéciation et la mobilité des éléments traces dans le sol (Parvin *et al.*, 2022). La classification des particules du profil a été réalisée sur la base de la répartition de la taille des particules du sol (Figure II.7). Cette distribution a révélé que ce profil contenait entre 50 % et 88 % du sable, de 6 % et 17 % du limon et de 1,5 % à 39,4 % d'argile. La richesse en sable dans l'ensemble du profil pourrait s'expliquer par la géologie de la région qui est caractérisée par des teneurs élevées en silice (Decrée *et al.*, 2008a). Par ailleurs, les résultats montrent la variation des niveaux d'argile. La plus forte teneur en argile (39,4 %) a été détectée à une profondeur de 468 cm, dont la présence induit une

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

compaction accrue du sol et limite le développement de la macroporosité, réduisant ainsi la connectivité des pores et la circulation des fluides. Ceci pourrait expliquer le résultat de la porosité. Ces observations pourraient être dues à l'altération chimique des minéraux primaires, comme le feldspath, en argile secondaire (Ouyang *et al.*, 2021). La présence des minéraux argileux secondaires dans le bassin de Tamra- Sidi Dris a été confirmée dans plusieurs études antérieures (Moussi *et al.*, 2011; Bouzidi *et al.*, 2018, 2020). Cependant, cette altération chimique est conditionnée par les caractéristiques spécifiques de chaque horizon du sol, notamment le pH, la matière organique, la température, l'humidité et les conditions hydrodynamiques (Robert *et al.*, 1980; Chen & Peng, 2018), ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus.

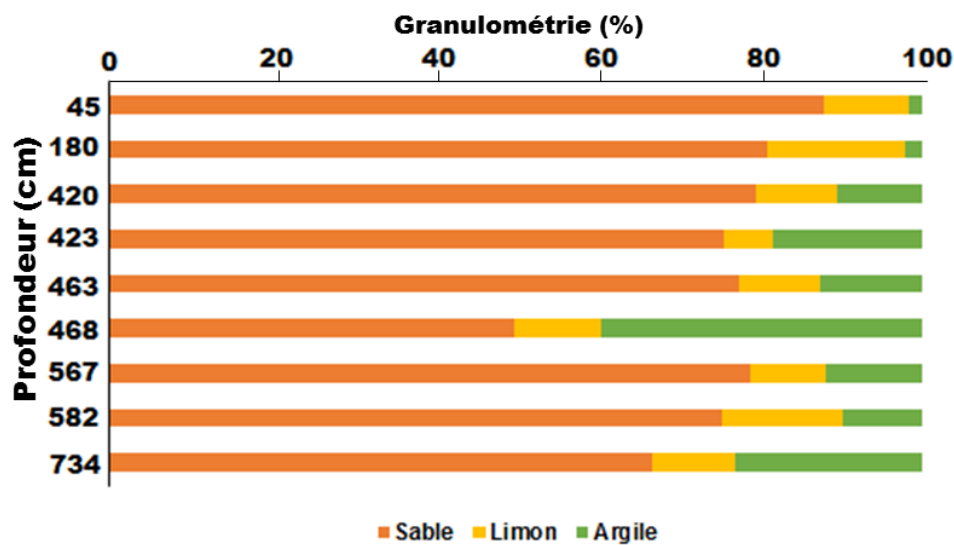


Figure II. 7. Granulométrie des sols du profil vertical

Le diagramme textural (Figure II.8) met en évidence une succession irrégulière d'horizons du profil pédologique, à textures sableuses, limoneuses et argileuses. Les deux premiers horizons jusqu'à une profondeur de 180 cm présentent une dominance sableuse accompagnée d'un enrichissement progressif en limon, traduisant une évolution texturale influencée par les processus de dépôt. Cette texture légère confère à ces horizons une sensibilité accrue à l'érosion hydrique et éolienne, ainsi qu'une vulnérabilité à l'incorporation de matériaux allochtones tels que les matériaux éoliens et colluviaux (Karaoğlu & Erdel, 2023). De tels dépôts exogènes pourraient modifier la dynamique physique du sol, notamment sa porosité, sa perméabilité et sa capacité de rétention en eau et en ETM.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Trois horizons de transition (jusqu'à une profondeur de 463 cm) présentent des textures limono-sableuses incluant une couche de texture limono-sableuse-argileuse au centre. La formation de cette couche argileuse de nature stratiforme peut résulter de phénomènes d'illuviation ou de lessivage de l'argile des couches superficielles sous l'effet des précipitations. Plus précisément, les argiles sont véhiculées par les fluides percolant vers le bas et pourraient s'accumuler dans un horizon sous-jacent, constituant alors une couche plus riche en argile (Decrée *et al.*, 2008a ; Zhang *et al.*, 2024). De même, à 468 cm de profondeur, la texture devient argilo-sableuse, ce qui indique une prédominance d'argile. Cela peut refléter une accumulation illuviale accompagnée de processus d'altération plus intenses (Scarciglia *et al.*, 2016) .

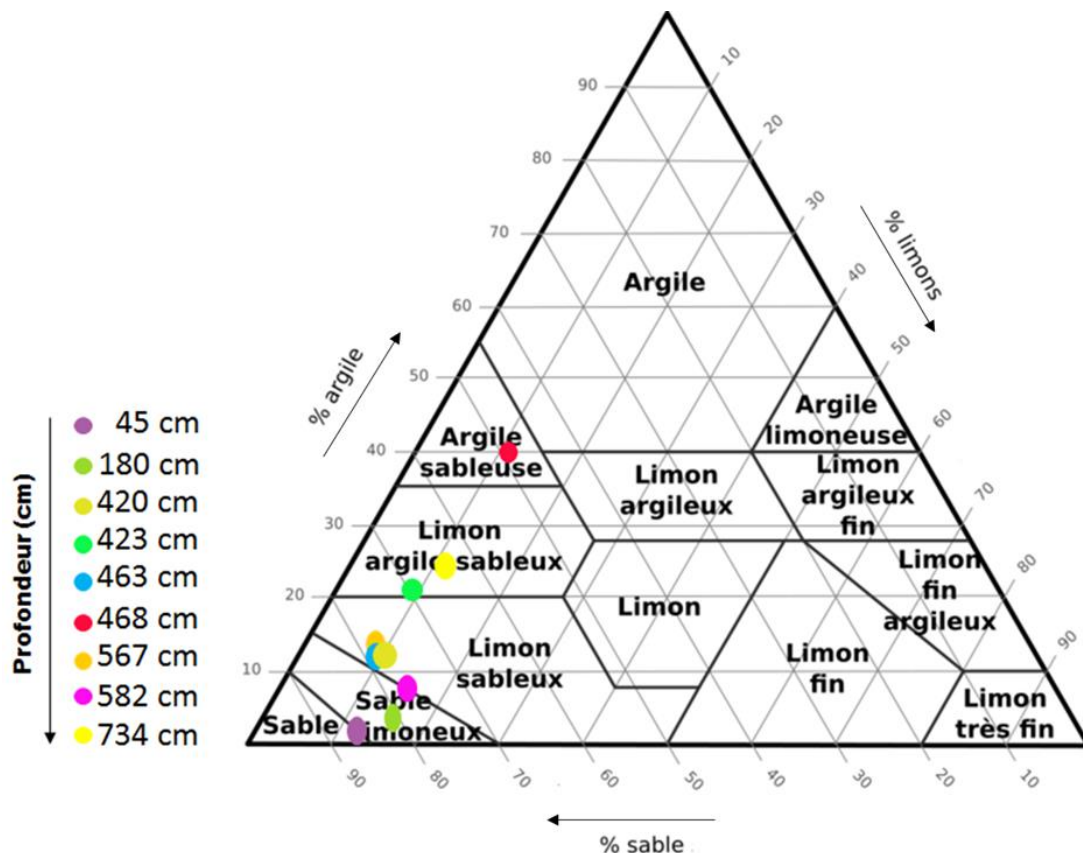


Figure II. 8. Classification des sols du profil vertical selon le diagramme des textures.

Enfin, les trois horizons les plus profonds (jusqu'à 734 cm), présentent des textures plus limono-sableuses et limon-argilo-sableuses. Cette variabilité reflète une hétérogénéité verticale probablement liée à l'action combinée de processus naturels de pédogenèse tels que le

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

lessivage, l'illuviation ou encore l'altération des matériaux d'origine (Scarciglia *et al.*, 2016 ; Pereira *et al.*, 2024). En effet, le contexte géologique de la mine de Tamra, bien documenté (Decrée *et al.*, 2008a ; Decrée *et al.*, 2010 ; Dekoninck *et al.*, 2018 ; Trifi *et al.*, 2022 ; Kraiem *et al.*, 2024) conditionne directement la nature texturale du sol et la distribution granulométrique, et influence la mobilité verticale et la spéciation des éléments traces vers les nappes phréatiques.

En résumé, la caractérisation physico-chimique du profil de sol révèle des discontinuités lithologiques marquées entre les différents horizons. Ces hétérogénéités texturales mettent en évidence une influence combinée de la pédogenèse et de la nature lithologique du sol influençant ainsi la répartition et la mobilité verticale des ETM. Elle impacte fortement la circulation de l'eau, la stabilité structurale du sol et, par conséquent, la mobilité des ETM. Pour mieux évaluer plus finement leur biodisponibilité et identifier les risques potentiels associés, une extraction séquentielle a été ensuite réalisée sur les différents horizons du profil.

3.2. Spéciation des éléments traces métalliques (ETM)

La spéciation chimique des ETM dans le sol permet d'identifier les différentes fractions auxquelles ces éléments sont associés dans la matrice du sol, , ce qui est crucial pour évaluer leur biodisponibilité ainsi que leur impact potentiel sur l'environnement et la santé humaine (Ahn *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2023a). Les résultats de la spéciation des ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans les différents horizons du profil vertical sont présentés dans la Figure II.9.

L'ordre de répartition des fractions biodisponibles et non biodisponibles de ces ETM dans l'ensemble du profil pédologique est le suivant :

Fe, Zn, et Pb : résiduelle > oxydable > réductible > échangeable (Figure II.9a, b, e) ;

Cd : résiduelle > oxydable > échangeable > réductible (Figure II.9d) ;

Mn : oxydable > résiduelle > réductible > échangeable (Figure II.9c) ;

As : résiduelle > échangeable > oxydable > réductible (Figure II.9f) ;

Le fer était principalement associé à la fraction résiduelle (F4), représentant 98,6 à 99,6 % du total dans les différents horizons du profil. Les fractions oxydables (F3) et réductibles (F2) sont très faibles (de 0,388 à 1,20 % et de 0,012 à 0,238 % respectivement) (Figure II.9a). Alors que la fraction labile (F1) était négligeable (de 0,006 à 0,014 %), ce qui indique une très faible mobilité. En effet, les sols du site minier de Tamra sont riches en minéraux ferriques secondaires stables tels que l'hématite et la goethite peu solubles sans conditions acides

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

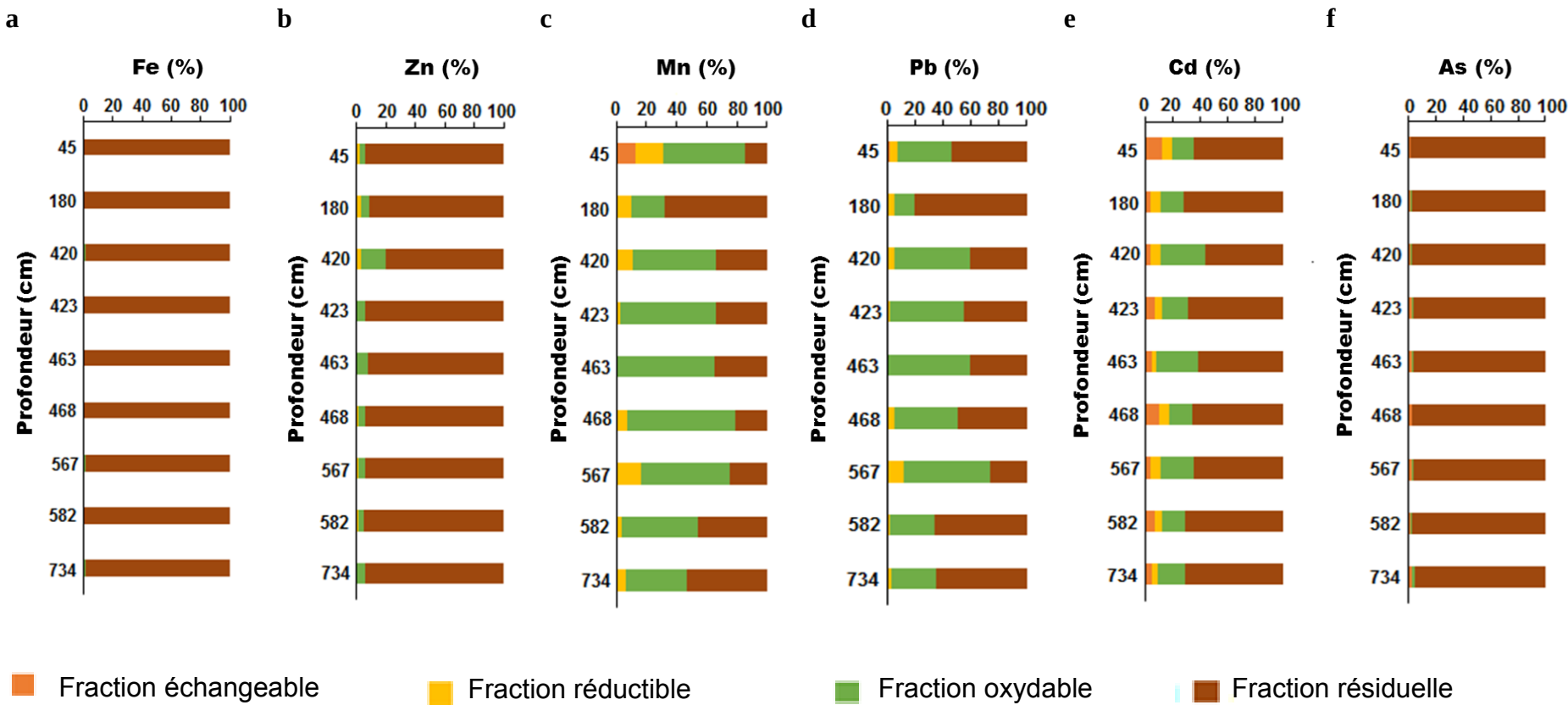


Figure II. 9. Pourcentages des éléments traces dans chaque fraction d’après l’extraction séquentielle de BCR : **a)** fer (Fe, %) ; **b)** zinc (Zn, %) ; **c)** manganèse (Mn, %) ; **d)** plomb (Pb, %) ; **e)** cadmium (Cd, %) ; et **f)** arsenic (As, %)

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

extrêmes (Decrée et al., 2008b ; Dekoninck et al., 2018; Bouzidi et al., 2020; 2022), mais le risque de remobilisation différée reste possible en cas de modification des conditions redox ou de décomposition de la matière organique. De même, le zinc était principalement associé à la fraction résiduelle (F4) qui varie de 80,25 à 95,07 %, suivi de la fraction organique (F3) de 4,08 à 16,81 %.

Les fractions réductibles (F2) et échangeables (F1) sont faibles et varient de 0,07 à 2,88 % et de 0,05 à 0,58 % respectivement (Figure II.9b). Cela suggère un lien fort entre le Zn et la matière organique et les sulfures du sol. Ceci pourrait s'expliquer par la capacité de la matière organique à complexer le zinc en réduisant ses énergies de liaison et d'adsorption du zinc sur les surfaces minérales du sol. Cela favorise la formation de complexes organo-métalliques stables, conduisant à une accumulation du Zn dans la fraction oxydable (Fan *et al.*, 2016). En outre, Smieja-Król *et al.* (2024) ont prouvé que les sulfures peuvent interagir avec la MO, entraînant ainsi la formation de phases solides stables qui diminuent la biodisponibilité du zinc. Le plomb se retrouve principalement dans la fraction résiduelle (26,13 à 79,88 %) (Figure II.9d), probablement sous forme de galène (PbS), qui s'altère très lentement du fait de sa faible solubilité (Decrée *et al.*, 2008b ; Trifi *et al.*, 2018). La fraction organique (F3) est également importante (variant de 14,82 à 62,2 %), ce qui représente un pourcentage considérable expliqué par la forte affinité du Pb^{2+} avec les groupements fonctionnels organiques tels que l'acide humique ainsi que les ligands soufrés (Liu *et al.*, 2023c; Wang *et al.*, 2023). Ces interactions favorisent ainsi la formation de complexes stables entre le plomb et la matière organique, contribuant à son accumulation dans cette fraction. La fraction réductible est modérée (F2 : de 0,65 à 11,21 %), tandis que la fraction labile et échangeable (F1 : 0,10 à 1,85 %) reste faible. La proportion la plus élevée de la fraction labile est enregistrée dans l'horizon superficiel (1,85 %). Ceci pourrait être dû à la présence de la matière organique fraîche, capable de former des complexes facilement solubles avec le Pb (Wang *et al.*, 2023) augmentant ainsi sa biodisponibilité dans cette couche. Le cadmium, quant à lui, est principalement associé à la fraction résiduelle, variant de 55,97 à 72,44 %, suivie par la fraction oxydable F3, qui varie de 15,8 à 32,39 % (Figure II.10e). La fraction échangeable (F1) est la plus importante (de 3,84 % à 11,98 %), et enfin la fraction réductible (F2) varie de 3,58 à 7,76 %. La fraction échangeable (F1) du Cd présente la proportion la plus élevée dans l'horizon superficiel du profil pédologique par rapport aux autres éléments. Cette répartition s'explique principalement par la forte mobilité

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

du Cd dans le sol, favorisée par sa faible affinité pour les phases solides. Par ailleurs, la contamination polymétallique du sol pourrait entraîner une compétition ionique entre Cd^{2+} et d'autres cations métalliques pour les sites d'adsorption, notamment ceux portés par les oxydes, l'argile et la matière organique. Cette compétition réduit la rétention du Cd sur les phases solides et augmente sa concentration dans la solution du sol, conduisant ainsi à une accumulation relativement élevée dans la fraction labile par rapport aux autres éléments (Ferreira *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2023b). Le manganèse est principalement présent dans la fraction oxydable (F3) avec des proportions variant de 22,34 à 71,4 % (Figure II.9c), en raison de sa forte affinité avec la MO (Allard *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2023). Ensuite, la fraction résiduelle représente 21,34 à 67,6 %, puis la fraction réductible varie entre 0,74 et 18,83 %. Bien que la fraction échangeable soit faible (0,02 à 12,53 %), la proportion la plus élevée a été enregistrée dans l'horizon superficiel du profil, suggérant un risque de mobilité important dans les couches superficielles. Ceci pourrait être dû à la présence de la matière organique (Figure II.6c), où le Mn peut se fixer sur des sites d'échange situés à la surface des particules du sol (Li *et al.*, 2021). En ce qui concerne l'As, proportion la plus élevée dans les différents horizons de ce profil se trouve dans la fraction résiduelle, allant de 93,7 à 95,5 % (Figure II.9f), ce qui suggère qu'il est majoritairement associé à des minéraux primaires peu altérés tels que les silicates et les oxydes cristallisés (Ackermann *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014). Les autres fractions (échangeable : 1,09 à 2,49 % ; oxydable : 0 et 1,9 % et réductible : 0 et 0,8 %) sont très faibles mais la faible proportion d'As échangeable peut tout de même représenter un risque environnemental non négligeable.

3.3. Facteurs influençant la mobilité des ETM

Afin de mieux comprendre les relations qui existent entre les caractéristiques physico-chimiques et les concentrations biodisponibles des ETM étudiés, à savoir Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As dans les sols du profil pédologique, des corrélations de Pearson ont été calculées (Tableau II.2). Ainsi, il n'y a globalement aucune forte corrélation n'a été observée entre les paramètres physico-chimiques (pH, CE, Ss, MO et teneur en argile) et la concentration biodisponible du Fe, du Zn, du Pb, du Cd, et d'As. En effet, en contexte de contamination polymétallique, des interactions complexes peuvent exister entre les métaux, comme la compétition pour les sites d'adsorption ou la formation de complexes mixtes, ce qui atténue l'effet direct des paramètres physico-chimiques. Par ailleurs, seul le Mn était fortement corrélé avec CE ($r = 0,74$),

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

Tableau II. 2. Corrélation de Pearson entre les concentrations biodisponibles des éléments traces et les caractéristiques physico-chimiques des sols du profil pédologique ($p < 0,05$).

	pH	CE	Ss	MO	P	K	As	Cd	Fe	Mn	Pb	Zn
CE	0,7378											
Ss	0,2096	-0,3239										
MO	0,6572	0,94	-0,4104									
P	0,2489	0,5429	-0,6954	0,634								
K	0,408	0,8311	-0,6718	0,8459	0,8292							
As	0,2746	-0,2348	0,2592	-0,1656	0,073	-0,341						
Cd	0,2773	0,0167	0,1352	0,2387	0,3181	0,0619	0,3976					
Fe	-0,3449	-0,4791	0,1594	-0,4688	0,023	-0,4362	0,5313	0,1836				
Mn	0,3847	0,7437	-0,3989	0,6971	0,6184	0,7693	-0,4452	0,2259	-0,1961			
Pb	-0,205	0,1221	-0,4883	0,2842	0,7125	0,3776	0,1966	0,2298	0,4736	0,2167		
Zn	-0,3745	-0,1077	-0,4209	-0,0585	0,5803	0,1836	0,0892	0,1956	0,6883	0,3556	0,7701	
% argile	0,5276	0,473	0,4771	0,2692	-0,1631	0,1436	-0,1565	-0,198	-0,0816	0,2633	-0,2324	-0,3043

Conductivité électrique (CE, $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) ; teneur en matière organique (MO, %) ; surface spécifique (Ss, $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ; perméabilité (K, $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$) ; porosité (P, %) ; teneur en argile (argile, %). Les valeurs en gras représentent les coefficients de corrélation les plus significatifs, qu'ils soient fortement positifs ou fortement négatifs

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

MO ($r = 0,69$), K ($r = 0,76$) et P ($r = 0,61$). Le Mn, en tant qu'élément redox-sensible, sa mobilité accroît en conditions réductrices souvent associées à une forte activité microbienne et à une richesse en matière organique. La porosité et la perméabilité facilitent les échanges gazeux et hydriques, modifiant ainsi les conditions redox et favorisant la mise en solution du Mn sous forme Mn^{2+} . De même, une moyenne à forte corrélation positive entre la porosité et le Zn ($r = 0,58$) et le Pb ($r = 0,71$). Ces résultats suggèrent que la mobilité du Mn, du Zn, et du Pb dépend fortement de la porosité du sol. Ce constat est en accord avec Yeboah *et al.*, (2019) qui ont révélé que dans les sols de texture sableuse limoneuse, qui se caractérisent par une porosité plus élevée, le Pb biodisponible dans la solution du sol augmente. Par ailleurs de fortes corrélations positives entre le Zn et le Pb ($r = 0,77$) et entre le Zn et le Fe ($r = 0,68$) ont été enregistrées, ce qui pourrait s'expliquer par des associations géochimiques entre ces éléments. Des corrélations similaires ont été observées par Li *et al.*, (2005) et Santoro *et al.*, (2024). En outre, une corrélation positive modérée existe également entre l'As et le Fe avec $r = 0,53$, probablement en lien avec l'adsorption de l'As sur les oxyhydroxydes de fer (Jain & Maiti, 2022).

3.4. Quantification de la pollution et évaluations des risques associés aux ETM

Afin d'évaluer la pollution et les risques liés aux ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) et d'étudier la variabilité verticale de la pollution du site minier de Tamra, plusieurs indices de pollution ont été calculés. La Figure II.10a présente les résultats de facteur de contamination (FC) pour tous les éléments étudiés et pour chaque horizon du profil. Les FC du Fe, du Zn, du Mn, du Pb, du Cd et d'As varient respectivement de 2,38 à 4,15 ; de 17,6 à 217 ; de 1,93 à 40,53 ; de 175,02 à 2238,9 ; de 48,72 à 127 et de 575,77 à 1311,3.

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

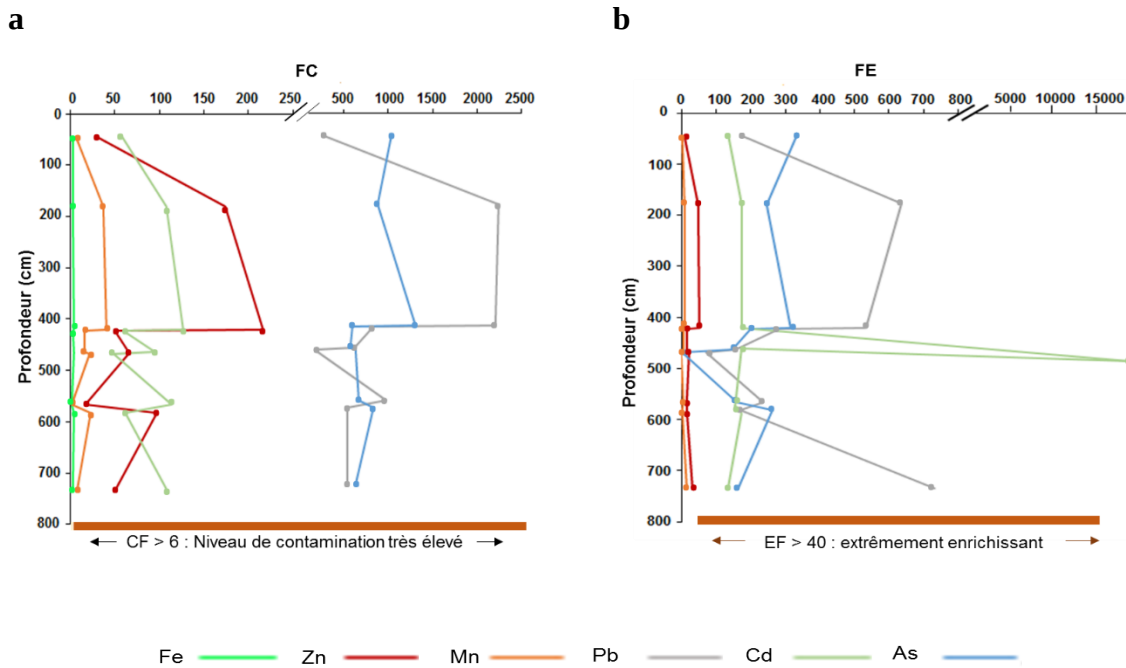


Figure II. 10. a) Facteur de contamination (FC) et **b)** Facteur d'enrichissement (FE) des échantillons du profil pédologique.

La contamination en fer était considérée comme modérée, sauf aux profondeurs de 423 cm et de 567 cm, où il était faiblement contaminé. Ceci pourrait être dû à sa forme minéralogique plus stable, c'est-à-dire moins solubles (Timofeeva *et al.*, 2024). En revanche, pour les autres éléments étudiés, les valeurs de FC étaient très élevées dans la majorité des horizons, à l'exception de Mn à la profondeur de 567 cm.

De même, le facteur d'enrichissement (FE) varie d'un horizon à l'autre (Figure II.10b). Le FE du Zn varie de 9,61 à 52,34, indiquant un enrichissement allant de très à extrêmement élevé. En ce qui concerne le Mn, le FE suggère une concentration modérée à élevée dans la majorité des horizons, à l'exception de la profondeur de 468 cm où une valeur de FE est très faible (0,81) a été enregistrée. Tandis que le FE du Pb révèle un enrichissement extrêmement élevé pour les différents horizons, où les valeurs varient de 73,49 à 730,75, ce qui témoigne d'un niveau de pollution particulièrement préoccupant. Pour le Cd, le facteur d'enrichissement indique une contamination considérable, avec des niveaux allant de modérément élevées à très élevées. Alors que le FE de l'As était extrêmement élevé ($FE > 40$), indiquant une grave pollution anthropique, à l'exception du niveau de 468 cm de profondeur où le $FE < 2$. D'après Charzyński

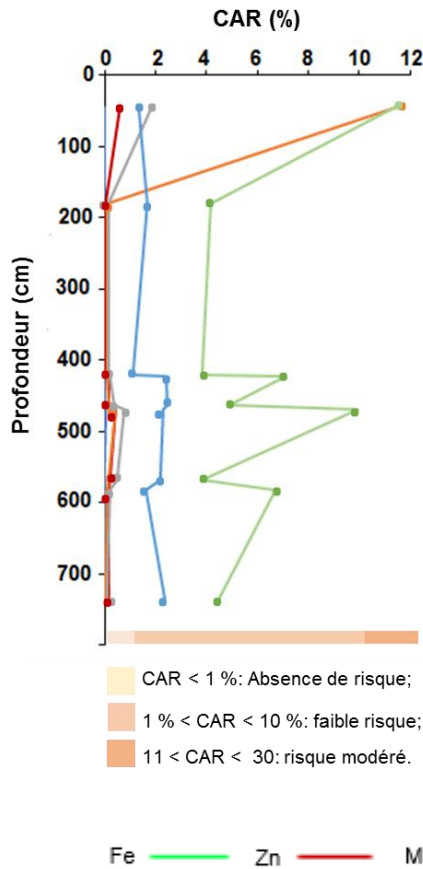
Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

et al., (2017), les FE supérieures à 5, pour Zn, Mn, Pb, Cd et As dans tous les horizons du profil pédologique confirment une pollution d'origine anthropique et non par des matériaux cristallins ou des processus d'altération naturelle. Seuls quelques échantillons, notamment l'As à 468 cm de profondeur et le Mn à 45, 468 et 582 cm de profondeur, présentent des valeurs inférieures à 5, indiquant que ceux-ci sont issus de processus d'altération naturelle (Charzyński *et al.*, 2017). Dans la présente étude, le code d'évaluation des risques (CAR) a été appliqué aux six éléments traces étudiés (Fe, Mn, Zn, Pb, Cd et As) dans les différents sols du profil vertical (Figure II.11a). D'après Perin *et al.*, (1985), le Fe et le Zn ne présentent aucun risque pour l'environnement, en raison de leur très faible fraction labile, qui varient de 0,006 à 0,014 % et de 0,05 à 0,58 % respectivement (Figure II.9a, b). Pour le Mn, le CAR a révélé un risque moyen dans les sols de surface (CAR = 11,45 %), tandis qu'aucun risque n'a été enregistré dans les sols de fond (CAR < 1 % en profondeur). Pour le Pb, le CAR ne suggère aucun risque pour tous les sols du profil, à l'exception de l'horizon de surface, qui présente un faible risque pour l'environnement (CAR = 1,83 %). Le CAR de Cd et d'As suggère un faible risque pour tous les sols du profil (1 % < CAR < 10 %), à l'exception du Cd dans l'horizon de surface (CAR = 11,42 %), qui présente un risque modéré pour l'environnement. Dans l'ensemble, les résultats du CAR suggèrent une pollution environnementale nulle à faible pour les éléments étudiés dans les différents niveaux du profil, à l'exception de Cd et de Mn dans les sols de surface (0 – 45 cm). Ce faible niveau de risque s'explique par la forte proportion des ETM présents dans la fraction résiduelle, réputée peu mobile et peu biodisponible, limitant ainsi leur potentiel de contamination.

L'évaluation de la contamination du sol peut également se faire à l'aide de la méthode de Muller (1969). L'indice de géoaccumulation (Igeo) permet d'estimer l'intensité de la contamination anthropique du sol. Dans la présente étude, l'ordre des valeurs Igeo moyenne des éléments traces étudiés dans ce profil vertical est le suivant : Fe < Mn < Zn < Cd < As < Pb (Figure II.11a).

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

a



b

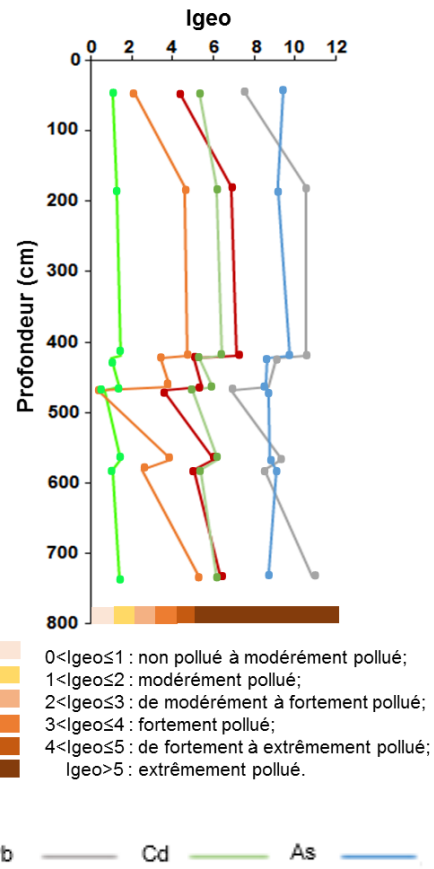


Figure II. 11. a) code d'évaluation des risques (CAR, %) et **b)** indice de géoaccumulation (Igeo) des échantillons du profil pédologique.

D'après Buccolieri *et al.* (2006), l'indice de géoaccumulation du Fe suggère une contamination modérée pour tous les horizons du sol, sauf à 468 cm de profondeur, qui se trouve dans la classe non polluée à modérément contaminée. Ceci pourrait être lié à la forte teneur en argile (Figure II.7). En effet, l'argile se caractérise par sa grande surface spécifique et sa charge négative. Ces propriétés lui permettent d'absorber et de fixer les ETM, les rendant moins mobiles et, par conséquent, présentant moins de risques de contamination. L'indice de géoaccumulation du Zn suggère que ce métal appartient à la catégorie fortement à extrêmement contaminée (Figure II.11b). En revanche, les Igeo du Mn varient largement selon les horizons, allant de la classe « non pollué » à « modérément pollué » ($0 < Igeo \leq 1$) et jusqu'à « extrêmement pollué » ($Igeo$

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

> 5), répartis en 6 classes. Pour le Pb, le Cd et l'As, les valeurs de Igeo étaient supérieures à 5, ce qui indique une extrême pollution des sols par ces éléments.

Dans l'ensemble, les résultats des valeurs de Igeo suggèrent que la contamination des sols de différents horizons de ce profil vertical par Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As est principalement d'origine anthropogénique ($I_{geo} > 1$) (Xu *et al.*, 2021), à l'exception du Fe à 423 cm, et à 468 cm et du Mn à 468 cm de profondeur, où l'Igeo est inférieur à 1, ce qui témoigne d'une d'origine naturelle (Xu *et al.*, 2021).

Les résultats du facteur de risque environnemental (FRE) sont présentés dans la Figure II.12a. Le FRE a montré un faible niveau de contamination pour tous les éléments traces étudiés dans ce profil vertical ($FRE \leq 0,4$) (Tytla, 2019). Cela est dû à leur concentration élevée dans les fractions oxydables (F3) et surtout résiduelles (F4). L'indice de charge polluante (ICP) est un indicateur utile pour déterminer la contamination du sol par les éléments traces. Pour tous les éléments étudiés, l'ICP est supérieur à 1, ce qui suggère une dégradation et une pollution anthropique du sol par les ETM dans les différents horizons du profil (Figure II.12b) (Tomlinson *et al.*, 1980). L'horizon à la profondeur de 420 cm, présente la valeur d'ICP la plus élevée, suggérant la propagation de la contamination à des couches plus profondes. Ceci pourrait être conditionné par la composition minéralogique de ces couches, notamment la présence des minéraux sulfurés et les processus d'altération (Niu *et al.*, 2019 ; Jiang *et al.*, 2020).

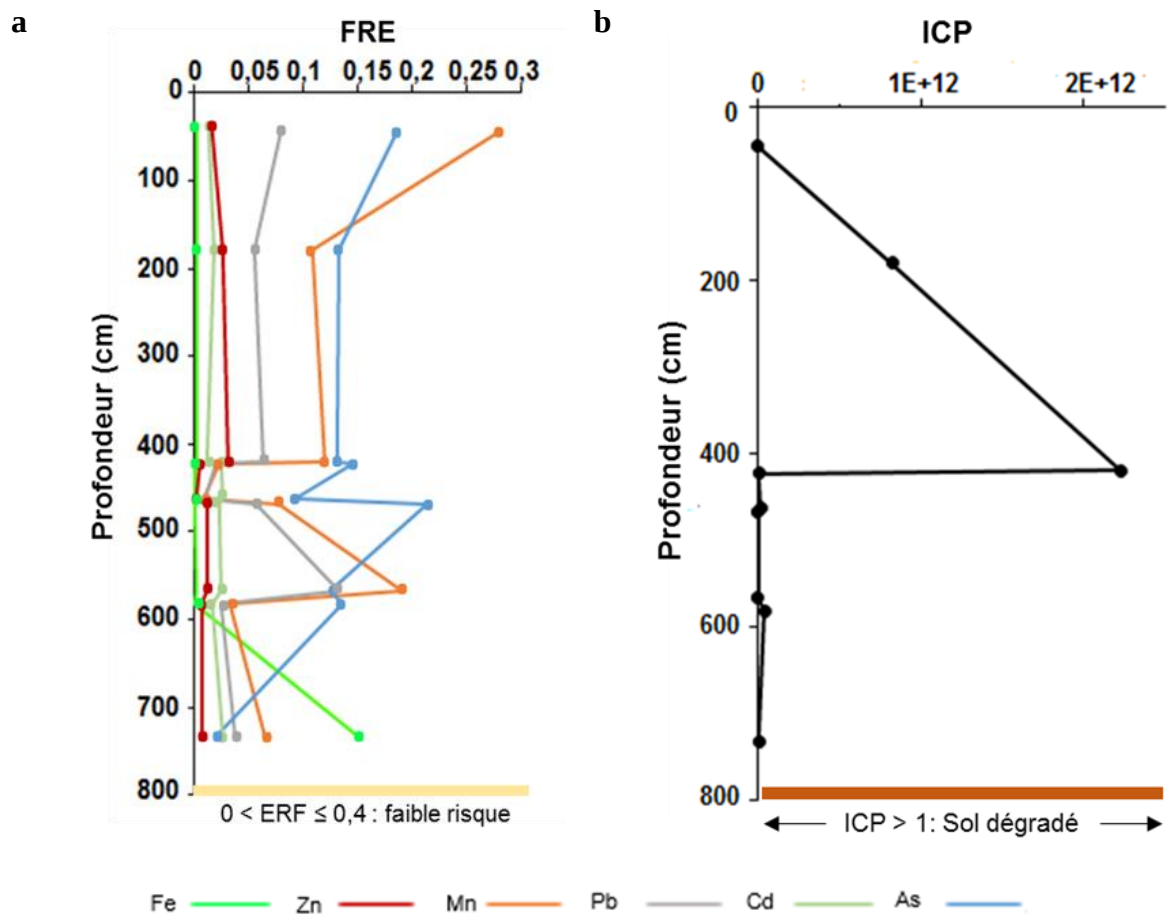


Figure II. 12. a) facteur de risque environnemental (FRE) et b) indice de charge polluante (ICP) du profil pédologique.

4. Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus mettent en évidence des discontinuités lithologiques dans les propriétés physico-chimiques du sol des horizons du profil pédologique. Ces hétérogénéités soulignent l'influence combinée de la pédogenèse et de la lithologie du sol sur la spéciation et la mobilité verticale des éléments traces étudiés. En outre, l'extraction séquentielle selon la méthode BCR a révélé des concentrations différenciées des ETM dans les différents horizons du profil. Ainsi, les fractions résiduelles et oxydables constituent les fractions dominantes pour tous les éléments traces étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As). La corrélation statistique de Pearson a confirmé que la porosité est un facteur déterminant pour la biodisponibilité du Mn, du Zn et du Pb. Cependant, la biodisponibilité du Mn dépend aussi fortement de la conductivité électrique, de la teneur en

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

matière organique et de la perméabilité du sol. Une étude minéralogique est donc recommandée afin d'identifier la nature et la composition des phases minérales présentes dans le profil et de déterminer les phases porteuses des éléments traces métalliques examinés. Cette approche permettrait de mieux comprendre les mécanismes de rétention, de mobilité et de disponibilité de ces éléments dans le sol. Selon le facteur d'enrichissement (FE), un apport anthropique important des ETM étudiés a été enregistré dans la plupart des horizons du profil. Parallèlement, le facteur de contamination a confirmé le niveau élevé de contamination de tous les éléments dans les différentes couches, dépassant les seuils critiques à l'exception du Fe. L'indice de géoaccumulation a révélé que le Fe, le Zn, le Mn, le Pb, le Cd et l'As provenaient de sources anthropiques ($I_{geo} > 1$). Nous avons également constaté une pollution extrême du sol du profil par le Pb, le Cd et l'As. L'indice de charge polluante (ICP) a révélé également une pression polluante généralisée dans les différents niveaux du profil, en particulier à 420 cm de profondeur, ce qui confirme la propagation de la contamination vers les couches profondes. Par ailleurs, la présente étude souligne une contamination hétérogène entre les différents horizons du profil pédologique, avec un risque potentiel de diffusion des éléments étudiés dans la nappe phréatique.

Ces résultats soulignent la nécessité d'une stratégie de réhabilitation ciblée, en particulier pour les horizons superficiels, en accordant la priorité aux éléments qui présentent des risques écologiques élevés, notamment le Pb, le Cd et l'As, afin de limiter leur propagation vers les nappes phréatiques. Bien que ces observations ouvrent des perspectives prometteuses en réhabilitation du site minier de Tamra, elles ne doivent pas occulter les limites de notre étude, notamment :

- (1) Des profils verticaux complémentaires à d'autres points du site seraient nécessaires pour valider les résultats obtenus ;
- (2) Une étude supplémentaire de la variabilité spatiotemporelle serait nécessaire pour évaluer la spéciation des ETM dans les couches profondes au fil du temps et en fonction des conditions hydrogéologiques ;
- (3) Des techniques analytiques avancées telles que la chromatographie ionique couplée à des techniques de spectroscopie seraient utiles pour mieux comprendre les transformations chimiques des éléments examinés dans les couches profondes et

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

préciser leurs formes biodisponibles, permettant ainsi une évaluation plus précise des risques associés ; Une analyse chimique de la couverture végétale de cette coupe (*Lawsonia inermis* L., *Phyllanthus tenellus* Roxb, *Crissa spinarum* L., et *Phyllirea latifolia* L.) devra être menée afin d'évaluer leur potentiel de phytoremédiation.

Conclusion

Le but de cette première phase de travail était de recueillir des informations sur le site minier de Tamra. Elle a permis de connaître les principales caractéristiques du sol de la mine : les propriétés physico-chimiques et minéralogiques, la qualité des sols, les spéciations de Fe, Mn, Zn, Pb, Cd et As, la sévérité de la pollution et les risques écologiques associés. Les résultats obtenus révèlent une grande hétérogénéité de tous les paramètres étudiés dans les deux séries d'échantillons (latérales et verticales) de ce site. L'extraction séquentielle de BCR a montré que les fractions résiduelles et les fractions d'oxyde Fe-Mn étaient dominantes pour tous les éléments, à l'exception du Fe et de l'As, qui sont principalement associés aux fractions résiduelles. Cette constatation suggère que la solubilisation de ces éléments dans des conditions naturelles est probablement limitée. Ces résultats doivent être associés à d'autres techniques telles que la diffraction des rayons X (pour le profil pédologique) et les extractions simples afin de compléter l'analyse de la spéciation réalisée. En effet, cette méthode d'extraction séquentielle ne manque pas de faiblesses, notamment la possibilité de redistribution des éléments traces étudiés durant les étapes. Par ailleurs, le fort degré d'acidité du site minier de Tamra, combiné à une faible activité enzymatique et à des sols gravement endommagés, indique que l'écosystème du sol a été gravement perturbé par les ETM présents. Globalement, la pollution observée a été modérée à grave, en particulier le Pb, l'As et le Cd représentant les toxines les plus préoccupantes et exigeant un assainissement immédiat. En outre, nous avons constaté qu'il existe également un risque potentiel de diffusion des ETM étudiés vers la nappe phréatique. La présente étude fournit une base pour la gestion environnementale future de la mine de Tamra. Elle confirme donc l'importance de mettre en place une stratégie de réhabilitation spécifique, en privilégiant les zones à fort risque écologique et intégrant les variations hydrologiques et la composition minéralogique du sol de Tamra. Ces observations seront prises en compte dans les

Chapitre II. Caractérisation de la contamination et évaluation des impacts environnementaux sur le site minier de Tamra

prochaines étapes du programme de recherche visant à limiter le transfert des contaminants vers les couches profondes du sol et les risques écologiques détectés.

**Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols
miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique
et la santé des populations locales**

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Introduction

Le chapitre précédent a mis en évidence la dégradation des sols du site minier de Tamra ainsi que les risques écologiques associés à la présence des ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As). Ces constats soulignent la nécessité de réhabiliter ces sols et de limiter leur impact environnemental. En effet, les fortes concentrations de ces éléments dans le sol représentent une menace écologique et sanitaire majeure (considérables) (Chauhan *et al.*, 2025; Liu *et al.*, 2025; Musa *et al.*, 2025). Dans ce contexte, l'évaluation de leurs effets sur les différents compartiments de l'environnement s'avère essentielle. Ce chapitre s'attache plus particulièrement à trois composantes importantes de cette question environnementale : i) l'effet des ETM sur la flore endémique du site minier de Tamra ; ii) l'évaluation de la qualité du réseau hydrique de ce site (les eaux de sources et de ruissellement) ; et iii) l'analyse des risques sanitaires liés à l'exposition humaine aux ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As). Ainsi, deux hypothèses ont été soulevées :

- (1) Certaines espèces végétales endémiques du site minier de Tamra présentent une tolérance accrue aux éléments traces dominants (Fe, Zn, Mn, Cd, Pb et As), due à leurs mécanismes physiologiques et/ou biochimiques spécifiques, qui leur confèrent un potentiel de phytoremédiation ;
- (2) La contamination polymétallique accrue sur le site minier de Tamra affecte la qualité du système aquatique et constitue un risque sanitaire pour la communauté locale exposée ;

Les objectifs poursuivis sont les suivants :

- Évaluer les impacts écotoxicologiques de la contamination polymétallique (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans un écosystème sous pression minière ;
- Étudier les conséquences sanitaires liées à cette contamination dans le contexte minier ;
- Fournir une base de données pour une future gestion efficace de ce site en intégrant les aspects sanitaires et environnementaux ;

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

1^{ère} partie : Évaluation du potentiel de bioaccumulation des éléments traces métalliques par les plantes autochtones du site minier de Tamra

1. Introduction

L'exploitation minière induit des altérations profondes et multifactorielles des sols, affectant leurs propriétés physiques, chimiques, structurelles et biologiques. En effet, ces perturbations, souvent irréversibles, exercent une pression intense sur les communautés végétales, modifiant drastiquement leur dynamique et leur diversité et conduisant à une dégradation prononcée des écosystèmes locaux. Face à ces conséquences, il devient essentiel de trouver des solutions innovantes afin de limiter ces impacts. Ainsi, la transition vers une réhabilitation minière écologiquement résiliente et économiquement viable nécessite une compréhension fine des bioindicateurs de la qualité des sols. À cet égard, la flore endémique émerge comme un bioindicateur privilégié pour évaluer le degré de dégradation écologique et le potentiel de restauration (Braga *et al.*, 2023 ; Cano-Ortiz *et al.*, 2024). Une analyse floristique détaillée permet non seulement de quantifier l'impact des ETM sur la biodiversité végétale, mais aussi d'identifier les espèces pionnières tolérantes aux stress abiotiques générés par l'activité minière. L'exposition chronique de ces espèces à des conditions édaphiques contraignantes telles que l'acidité du sol, la toxicité métallique et la carence en nutriments, opère une sélection naturelle. La composition floristique qui en résulte, appauvrie et spécialisée, est le reflet direct des altérations du site. Ainsi, le déclin observé dans la richesse et l'abondance spécifiques, couplé à la dominance d'espèces métallobytophytes, témoigne de la dégradation progressive de l'écosystème et fournit des indications cruciales pour guider les stratégies de réhabilitation. Dans ce contexte, la mine de Tamra est considérée comme un moteur économique national important. Cependant, elle entraîne des changements profonds dans l'environnement, en raison de sa forte contamination polymétallique (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, Pb et As). Ces contaminants peuvent s'accumuler dans les différentes compositions de l'écosystème, dans lesquels ils peuvent avoir des effets écotoxiques majeurs. Ainsi, ce site possède des caractéristiques écologiques et environnementales qui le rendent essentiel pour comprendre l'impact des ETM présents sur la flore locale. Par ailleurs, les espèces endémiques constituent une ressource fourragère importante pour le bétail des agriculteurs locaux (Figure III.1). Elle est toutefois

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

susceptible d'accumuler les éléments traces présents dans leurs tissus, ce qui soulève des préoccupations environnementales et sanitaires supplémentaires.



Figure III. 1. Bétail pâturant sur le site minier de Tamra (AO©).

Un tel processus facilite le transfert de ces contaminants le long de la chaîne alimentaire, depuis ces plantes vers le bétail, puis potentiellement vers l'Homme *via* la consommation de produits d'origine animale. Ce transfert des ETM peut entraîner une contamination chronique de l'ensemble du système agroalimentaire, compromettant à la fois la sécurité alimentaire et la santé humaine. Par conséquent, l'évaluation de la flore endémique du site d'étude constitue une étape essentielle pour analyser les mécanismes de transfert et d'accumulation des ETM dans les plantes, ainsi que pour comprendre et anticiper leurs effets à long terme. Cependant, à nos jours, aucune étude n'a été réalisée pour inventorier la flore présente dans cette zone, rendant cette étude d'autant plus importante. Ce travail novateur pourrait constituer une base de données et ouvrir de nouvelles pistes pour la recherche future sur la réhabilitation écologique.

Les objectifs généraux de cette étude consistent à :

- Comprendre les mécanismes de tolérance de ces espèces permettra de mieux comprendre les mécanismes de leur adaptation ;
- Utiliser ces espèces comme bioindicateurs de la contamination des sites par les ETM ;
- Intégrer ces espèces dans des programmes de revégétalisation de sites miniers, ceci permettra la restauration écologique ;

Pour ce faire, les objectifs spécifiques de cette étude visent à :

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

- Réaliser un inventaire floristique systématique afin d'établir un catalogue exhaustif de la biodiversité végétale du site ;
- Analyser les relations entre la contamination du sol en Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As et la distribution des espèces endémiques locales de ce site ;
- Identifier, parmi les espèces recensées, celles démontrant une capacité de tolérance accrue malgré les concentrations élevées en ETM ;
- Sélectionner les candidats les plus prometteurs pour des applications de phytoremédiation basées sur leurs capacités d'accumulation ou de stabilisation des ETM.

2. Matériel et méthodes

2.1. Choix des sites et méthodes de prélèvement des échantillons

En raison de la discontinuité du couvert végétal et du relief accidenté du site minier de Tamra, l'évaluation de la flore herbacée a été réalisée à partir de deux relevés floristiques ciblés. Ces relevés ont été menés sur deux sites distincts au centre de la mine soumise à des pressions similaires (Figure III.2). Le premier (R1) a été situé à proximité du site T₅ à 37° 3'14.6" N, 9°6'17.1" E alors que le second (R2) a été localisé à proximité du site T₆ à 37° 03'14" N, 009°06'08" E.

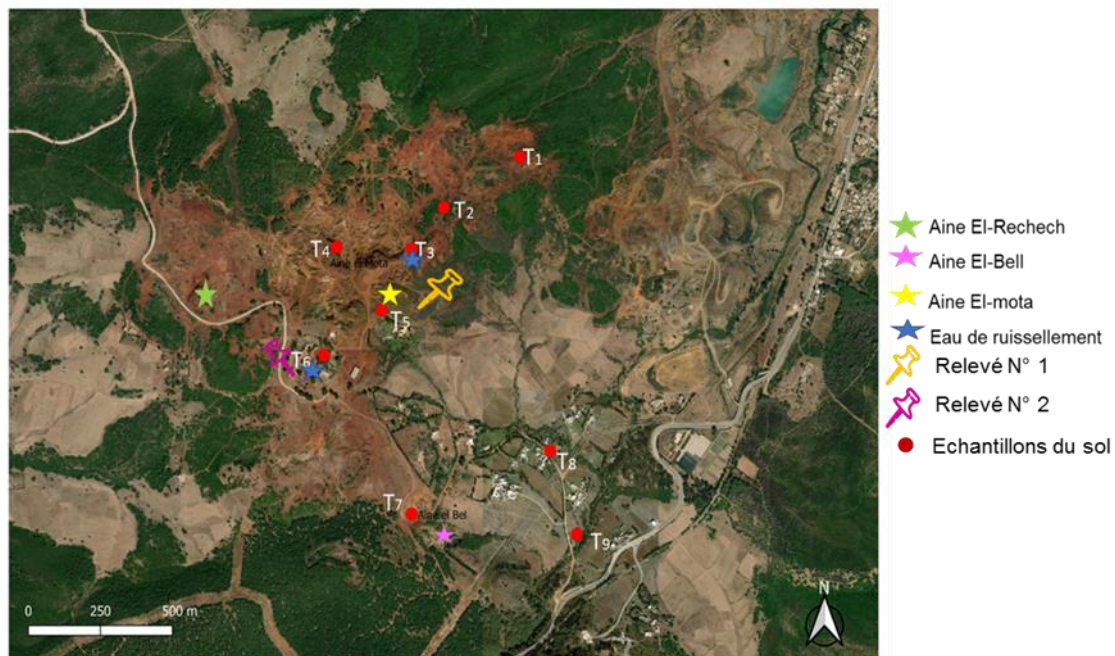


Figure III. 2. Localisation des relevés floristiques sur le site minier de Tamra

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Ces inventaires ont été réalisés au début du printemps (le 5 mars 2024) (Figure III.2a). Cette période correspond à la phase idéale de floraison pour de nombreuses espèces herbacées après la dormance hivernale, facilitant ainsi leur identification sur le terrain (Panda *et al.*, 2014.; Horbach *et al.*, 2023; Rauschkolb *et al.*, 2024). Le choix des zones a été guidé par la recherche d'une homogénéité du couvert végétal, évaluée sur la base d'un triplet de critères : *i*) la composition floristique ; *ii*) la physionomie incluant la stratification et la structure ; et *iii*) les caractéristiques écologiques abiotiques telles que la topographie.

Au sein de chaque zone homogène, la surface minimale d'inventaire a été déterminée selon la méthode de Braun-Blanquet (1932). Celle-ci correspond à l'aire à partir de laquelle le nombre d'espèces végétales recensées se stabilise. Conformément au protocole, la surface de relevé a été progressivement doublée jusqu'à ce qu'aucune nouvelle espèce ne soit détectée, définissant ainsi la surface minimale représentative (Figure III.3a) (Ellenberg & Mueller-Dombois, 1974). Cette approche, dite “des surfaces emboîtées”, garantit une évaluation fiable de la diversité spécifique d'une communauté végétale homogène et permet la collecte de données floristiques représentatives de l'écosystème étudié (Nsibande & Nkosi, 2023; Ivanova, 2024).

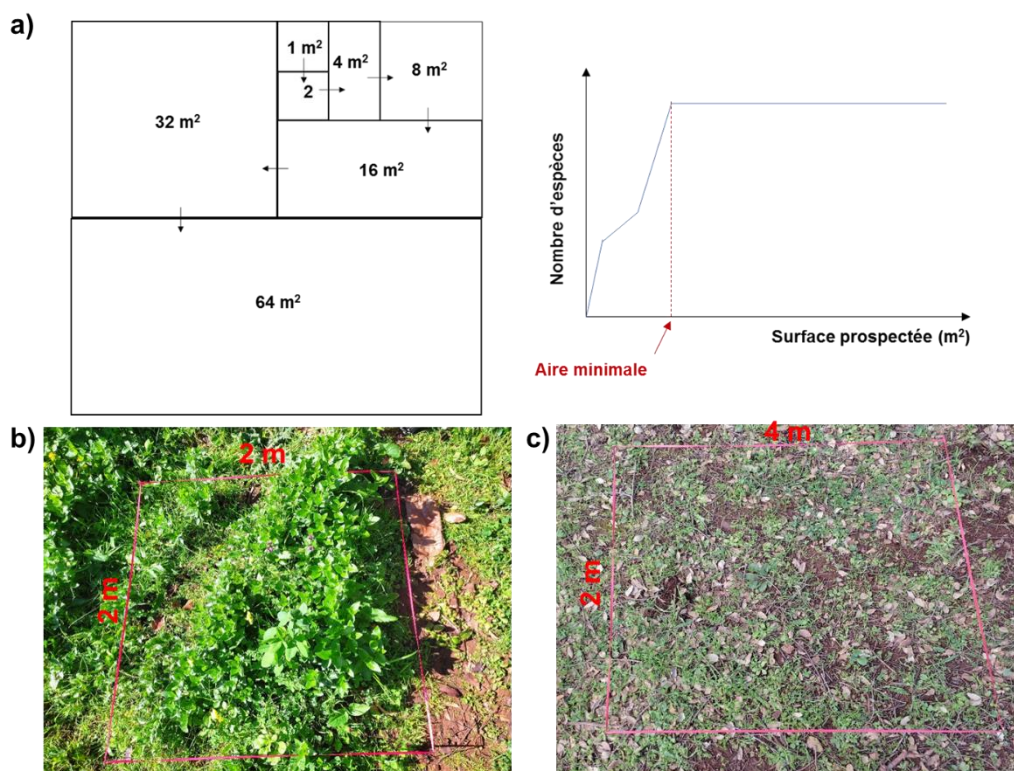


Figure III. 3. a) Méthodologie de détermination de l'aire minimale des relevés floristiques ; b) Photo du relevé floristique n° 1 ; c) Photo du relevé floristique n° 2.

2.2. Caractérisation des relevés floristiques

Pour chaque relevé de végétation, plusieurs paramètres floristiques et édaphiques ont été enregistrés. La localisation précise de chaque placette a été déterminée par GPS. La topographie, la lithologie et l'altitude ont été également documentées afin de caractériser les conditions stationnelles.

L'identification des espèces végétales a été soutenue à l'aide de clés d'identification et de l'ouvrage de référence « Catalogue synonymique commenté de la flore de Tunisie » (Le Floch *et al.*, 2011). Les noms scientifiques ont été confirmés et actualisés à l'aide de base de données taxonomique reconnue « The Plant List ». De plus, l'outil numérique « Pl@ntNet » a été utilisé pour faciliter la vérification sur le terrain. Toutes ces sources ont été comparées afin de garantir une identification fiable des espèces observées.

Chaque espèce identifiée a été associée à un coefficient d'abondance-dominance selon l'échelle de Braun-Blanquet (Tableau III. 1). Ce coefficient, évalué visuellement, intègre simultanément deux métriques : l'abondance, qui correspond au nombre d'individus de l'espèce présents, et la

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

dominance, qui reflète son degré de recouvrement au sein de la placette. Cette estimation, utilisée comme critère principal pour la sélection des espèces, est une pratique standardisée en analyse phytosociologique ; sa marge d'erreur est considérée comme négligeable à l'échelle de l'étude (Ma & Ellison, 2018 ; (Senni & Gerard, 2020)). Seules les espèces présentant les coefficients les plus élevés ont été retenues pour la détermination des concentrations en Fe, Mn, Zn, Pb, Cd et As par ICP-AES.

Tableau III. 1. Échelle des coefficients d'abondance-dominance de Braun-Blanquet (1932).

Coefficient	Signification
r	Rare
+	Peu d'individus, avec très faible recouvrement
1	Recouvrement faible < 1/20, ou individus dispersés à couvert jusqu'à 1/20 (5%)
2	Recouvrement entre 1/20 et 1/4 (5–25% de la surface de référence)
3	Recouvrement entre 1/4 et 1/2 (25–50% de la surface de référence)
4	Recouvrement entre 1/2 et 3/4 (50–75% de la surface de référence)
5	Recouvrement > 3/4 de la surface de référence (> 75%)

2.3. Propriétés physicochimiques des sols

Plusieurs paramètres physico-chimiques du sol, dont le pH, ont été mesurés *in situ* sur trois prélèvements. La mesure du pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre portable (HANNA Instruments, modèle HI 99121, États-Unis) préalablement étalonné, selon la norme NF ISO 10390. La salinité du sol a été déterminée à partir de la mesure de la conductivité électrique à l'aide d'un conductimètre portable modèle HI9930_ Hanna, USA, conformément à la norme NF ISO 11265. Enfin, l'humidité du sol a été mesurée à l'aide d'un humidimètre (Delta-T Devices, Cambridge, UK). Des prélèvements d'environ 1 kg de sol ont été réalisés à l'aide d'une tarière manuelle au centre de chaque relevé (Martin *et al.*, 2017). Ces prélèvements ont été transportés au laboratoire, puis séchés à température ambiante. Une première partie de sol a été utilisée pour l'analyse granulométrique par voie humide selon la norme XP P94-041. La seconde partie a été broyée et tamisée pour déterminer les concentrations des éléments traces (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As). Les concentrations pseudo-totales ont été déterminées en utilisant la méthode d'attaque à l'eau régale (HNO₃ (65 %) : HCl (37 %), 1:3 v/v) (Zhang & Selim, 2008). Cette méthode a été décrite de manière exhaustive dans l'article présenté dans la

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

première partie du chapitre (II) intitulé " Assessment of Trace Element Soil Contamination and Environment Risks in Soils from Iron Mining areas ".

L'extraction simple a été réalisée à l'aide d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2 , 0,01 M) afin de déterminer les concentrations biodisponibles de Fe, Mn, Zn, Pb, Cd et As. Cette approche, décrite pour la première fois par Houba *et al.* (1996), présente à la fois la simplicité de mise en œuvre et le faible coût comme avantages. Un gramme de sol a été mélangé avec 10 ml de la solution de CaCl_2 . Après 2 heures d'agitation à 50 tr/min à une température ambiante, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes à $3000 \times g$. Les surnageants ont finalement été filtrés à l'aide de filtres de type Whatman ($45 \mu\text{m}$), puis 5 ml de la solution ont été acidifiés avec 83 μl d'acide nitrique 65% (HNO_3). Ces échantillons ont été ensuite analysés par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, CL, USA).

2.3. Analyses des espèces végétales sélectionnées

Après l'identification des espèces collectées dans chaque relevé (Figure III.3a, b) les échantillons ont été lavés à l'eau courante puis à l'eau distillée pour garantir leur pureté. Cette étape est cruciale pour éliminer les particules de sol présentes au niveau des racines ainsi que les poussières fines adhérant à la partie aérienne assurant ainsi une analyse fiable et représentative des tissus végétaux. Les parties aériennes et racinaires ont ensuite été soigneusement séparées, puis séchées à l'étuve à 40°C pendant 72 heures (Nandillon *et al.*, 2019). Après séchage, les échantillons ont été finement broyés à l'aide d'un broyeur et stockés en conditions sèches en attendant les analyses ultérieures.

Pour la détermination des concentrations en Fe, Mn, Zn, Pb, Cd et As, une prise d'essai de 200 mg de matière sèche broyée a été soumise à une minéralisation acide assistée par micro-ondes (système Multiwave 3000, Anton Paar GmbH, Allemagne). La digestion a été réalisée à l'aide d'un mélange d'acides forts (3 ml d'acide chlorhydrique à 37 % et 6 ml d'acide nitrique à 65 %). Après refroidissement, les digestats ont été ajustés à un volume final de 25 ml avec de l'eau ultrapure, puis filtrés sur des filtres membranaires en cellulose de porosité $45 \mu\text{m}$ (Nandillon *et al.*, 2021).

La capacité des espèces végétales à accumuler les éléments traces présents dans le sol minier de Tamra a été quantifiée par le calcul du facteur de bioconcentration (FBC) entre les tissus de la plante et le sol (Luc *et al.*, 2022). La capacité de translocation (FT) des métaux des racines

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

vers les parties aériennes a été évaluée pour chaque espèce (Li *et al.*, 2007). Ces indices ont été calculés comme suit :

FBC = concentration des ETM dans les plantes / concentration des ETM dans le sol (1)

FT = concentration des ETM dans la partie aérienne / concentration des ETM dans la partie racinaire (2)

2.4. Analyses statistiques

Afin d'estimer les différences significatives entre les caractérisations du sol issues de deux relevés réalisés et les concentrations des ETM dans les organes des espèces étudiées, une analyse de variance unidimensionnelle (ANOVA) a été réalisée suivie du test LSD (Least Significant Difference) avec un seuil de confiance de 95 % ($p < 0,05$). Ensuite, une analyse en composantes principales a été effectuée pour étudier les relations entre les concentrations de Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As dans les parties aériennes et racinaires des espèces examinées.

3. Résultats

3.1. Diversité et composition floristique globale de la mine de Tamra

Conformément à la méthode de Braun-Blanquet (1932) et en s'appuyant sur la courbe aire-espèce, deux relevés ont été réalisés : le premier relevé (R1) sur une surface de 4 m² et le deuxième (R2) sur 8 m². Ces deux relevés ont permis de montrer la variété des espèces herbacées colonisant les sols miniers de Tamra. Au total, 23 espèces ont été recensées sur ce site (Tableau III.2).

L'analyse comparative des deux relevés révèle une richesse floristique relativement faible avec 15 espèces appartenant à 10 familles dans le premier relevé contre 10 espèces appartenant à 9 familles dans le second. Cette diversité apparaît réduite en comparaison avec d'autres sites miniers d'Afrique du nord tels que la mine Bou Craa, la mine Youssoufia, et la mine de Khouribga, au Maroc, où ont été respectivement répertoriées 54, 57 et 75 espèces végétales (Zine *et al.*, 2023). A l'inverse, la mine de fer de Rouina en Algérie se caractérise par une diversité végétale encore plus limitée caractérisée par quelques espèces pionnières très tolérantes (Bentellis & Rached, 2025). Cette (faible) diversification de la végétation spontanée du site minier de Tamra pourrait s'expliquer par la présence des contaminants et des activités minières qui s'y déroulent actuellement. Ces conditions hostiles empêchent beaucoup d'espèces végétales de se développer, ne laissant de place qu'à quelques espèces qui supportent bien le stress polymétallique et les sols dégradés (Alsherif *et al.*, 2022; Azizi *et al.*, 2023).

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Selon l'analyse de la composition floristique, la famille des *Asteraceae* est la plus représentée sur le site minier (4 espèces), mais avec un faible taux de recouvrement, ce qui en fait un groupe d'espèces rares sur ce site (Tableau III.2). Similairement, Noumi *et al.* (2010) ont montré que la famille des *Asteraceae* est la plus représentée sur les sites miniers en Tunisie, en particulier dans les régions du sud. Elle comprend plus de 172 espèces, représentant environ 13,5 % de la flore totale des régions centrales et septentrionales du pays. Ces résultats suggèrent ainsi son adaptation exceptionnelle aux environnements extrêmes (stress hydrique et forte contamination). De plus, El Mokni *et al.* (2022) ont identifié 16 nouvelles espèces de la famille *Asteraceae* en Tunisie, élargissant ainsi le nombre d'espèces végétales allochtones et soulignant leur capacité d'adaptation aux sols dégradés.

Par ailleurs, Les espèces communes dans les deux relevés sont les *Astraceae*, *Rubiaceae*, *Fabaceae*, *Oxalidaceae*, *Polygonaceae*, *Araceae* et *Scrophulariaceae*. Cependant, d'après le coefficient de recouvrement, les familles *Araceae*, *Apocynaceae*, *Rubiaceae* sont les plus dominantes, avec un taux supérieur à 75 %. Ces familles possèdent une large variété de formes biologiques et de types de végétations, leur permettant ainsi d'occuper diverses niches écologiques dans des milieux fortement perturbés (Boi *et al.*, 2023).

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Tableau III. 2. Composition floristique des relevés étudiés.

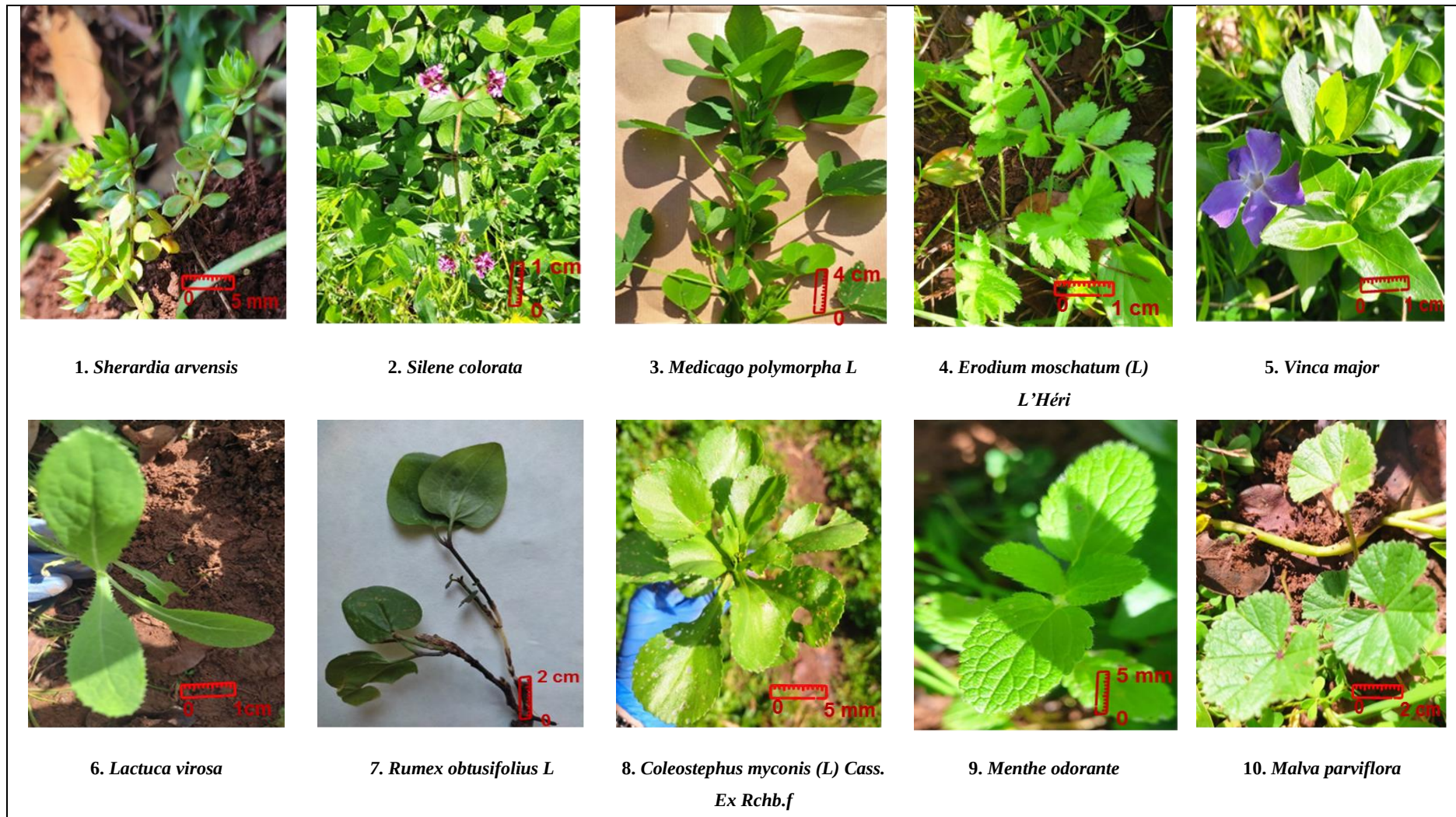
Relevés	Espèces	Familles	Noms usuels	Coefficient de recouvrement
Relevé n° 1 (R1)	<i>Sherardia arvensis</i>	<i>Rubiaceae</i>	Gratteron fleuri	+
	<i>Silene Colorata</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	Silène coloré	+
	<i>Medicago polymorpha</i> L	<i>Fabaceae</i>	Luzerne polymorphe	+
	<i>Erodium moschatum</i> (L) L'Héri	<i>Geraniaceae</i>	Erodium musqué	+
	<i>Vinca major</i>	<i>Apocynaceae</i>	Grande pervenche	5
	<i>Lactuca virosa</i>	<i>Asteraceae</i>	Laitue sauvage	1
	<i>Rumex obtusifolius</i> L	<i>Polygonacées</i>	Patience sauvage	+
	<i>Coleostephus myconis</i> (L) Cass. Ex Rchb.f	<i>Asteraceae</i>	Chrysanthème myconis	1
	<i>Menthe odorante</i>	<i>Lamiaceae</i>	Menthe sauvage	1
	<i>Malva parviflora</i>	<i>Malvaceae</i>	Mauve à petites fleurs	1
	<i>Galactite tomentosa</i> gato	<i>Asteraceae</i>	Chardon laiteux	+
	<i>Chamaemelum fuscum</i>	<i>Asteraceae</i>	Anthémis brunâtre	+
	<i>Oxalis pes-caprae</i>	<i>Oxalidaceae</i>	Oxalis penché	4
	<i>Arisarum vulgare</i> O Targ. Tozz	<i>Araceae</i>	Capuchan de moine	5
Relevé n° 2 (R2)	<i>Verbascum sinuatum</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	Molène noire	+
	<i>Verbascum sinuatum</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	Molène noire	1
	<i>Myosotis sicula</i>	<i>Boraginaceae</i>	Myosotis de silice	5
	<i>Rumex crispus</i> L.	<i>Polygonacées</i>	Patience sauvage	2
	<i>Paspalum conjugatum</i> P.J. Bergius	<i>Poaceae</i>	Paspalum conjugué	3
	<i>Oxalis pes-caprae</i>	<i>Oxalidaceae</i>	Oxalis penché	2
	<i>Sherardia arvensis</i>	<i>Rubiaceae</i>	Gratteron fleuri	5
	<i>Calicotome spinosa</i>	<i>Fabaceae</i>	Calicotome épineux	1
	<i>Galactite tomentosa</i> gato	<i>Asteraceae</i>	Chardon laiteux	2
	<i>Rumex obtusifolius</i> L	<i>Polygonaceae</i>	Patience sauvage	+
	<i>Arisarum vulgare</i>	<i>Araceae</i>	Capuchan de moine	+

Les caractères en gras indiquent les espèces sélectionnées présentant les coefficients de recouvrement les plus élevés.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Les espèces sélectionnées pour le dosage des éléments traces métalliques étudiés sont *Arisarum vulgare* O Targ. TOZZ, *Oxalis pes-caprae*, *Vinca major* (Figure III.4), *Myosotis sicula*, *Sherardia arvensis*, et *Paspalum* (Figure III.5). Ce choix repose sur leur taux de recouvrement supérieur à 25 %, reflétant une présence dominante et représentative sur le site minier de Tamra (Tableau III.1 ; 3.2). L'évaluation des concentrations en Fe, Mn, Zn, Pb, Cd et As dans leurs tissus ainsi que dans les sols correspondants permettra de mieux comprendre leur rôle potentiel dans la dynamique de ces polluants. Bien que cette étude nous fournisse une base de données sur la diversité de la flore herbacée du site de Tamra, elle présente également certaines limites qu'il convient de mentionner. En effet, elle repose seulement sur deux relevés en raison de l'accessibilité du site, qui est toujours en exploitation. Cela restreint la robustesse statistique des résultats obtenus. Par ailleurs, le critère de sélection des espèces basé sur un seuil de recouvrement supérieur à 25%, introduit des limites méthodologiques. Ces limites devraient être prises en compte pour des futures études.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales



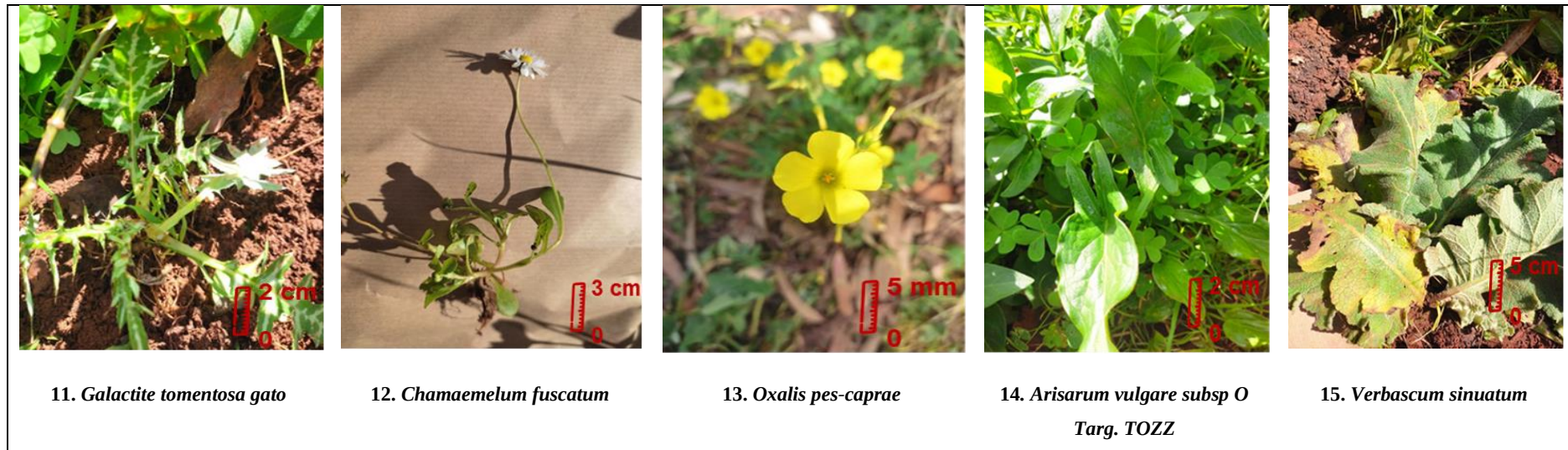


Figure III. 4. Images illustratives de toutes les plantes herbacées du relevé floristique n°1.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

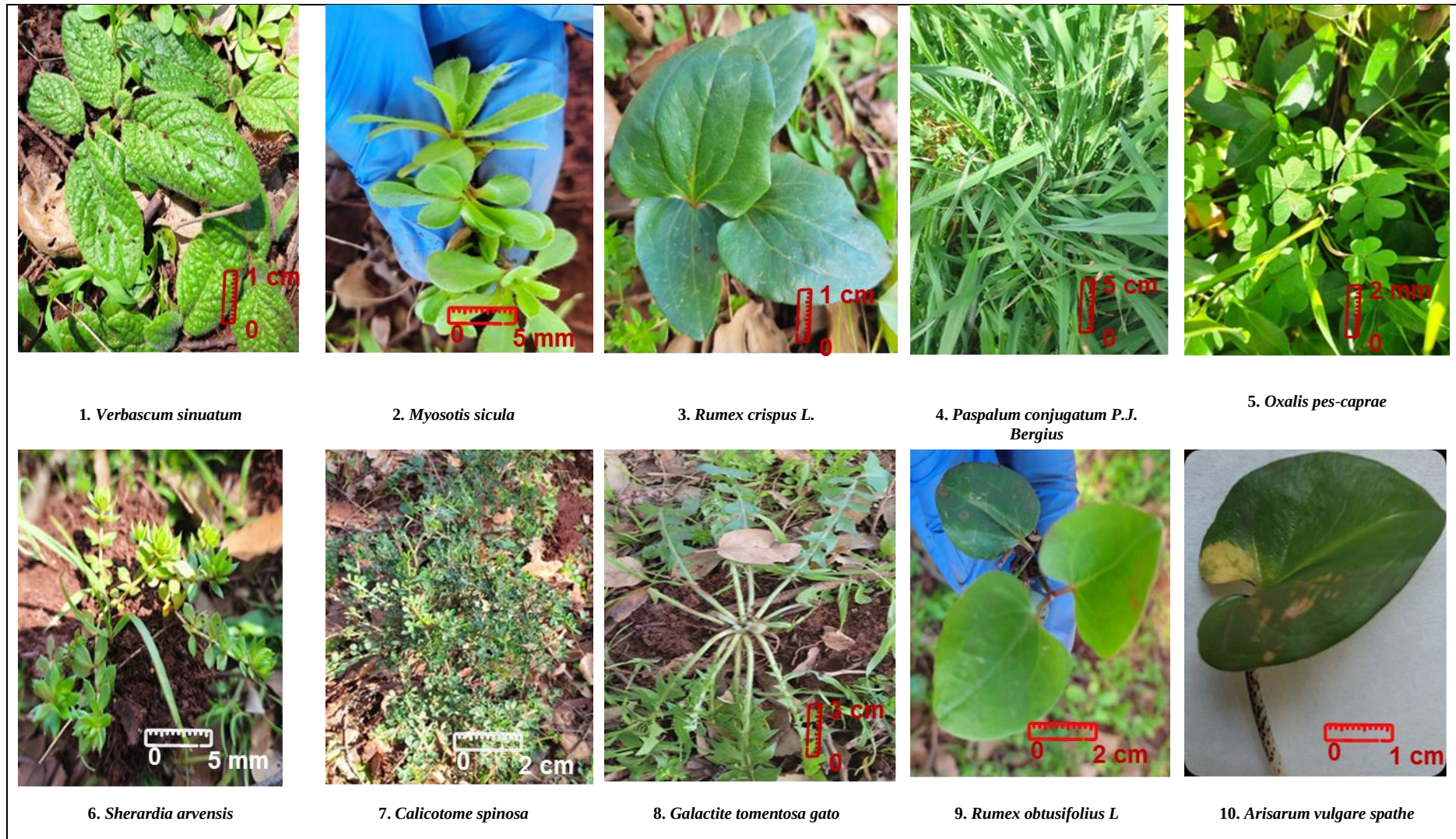


Figure III. 5. Images illustratives de toutes les plantes herbacées du relevé floristique n°2.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

3.2. Caractérisations physicochimiques des sols des relevés floristiques

Les analyses physicochimiques des sols issus des deux relevés floristiques révèlent montrent des différences notables (Tableau III.3). Les valeurs de pH et de conductivité électrique varient de manière significative ($p < 0,05$) entre les deux sols étudiés (R1 et R2). Selon la classification de l'USDA (1998), le sol R1 est neutre ($6,6 < \text{pH} < 7,3$) tandis que le sol R2 est légèrement acide ($6,1 < \text{pH} < 6,5$). Cette observation pourrait s'expliquer par la composition minéralogique hétérogène des sols de Tamra, ainsi que par les variations du taux de MO et de l'humidité qui peuvent agir sur le pH, comme le montrent les résultats de notre article intitulé « Assessment of trace element soil contamination and environment risks in soils from iron mining areas » accepté dans *International Journal of Environmental Science and Technology*. En outre, la présence des minéraux ferreux oxydables tels que les sulfures de fer (pyrite) favorise la libération de protons (H^+) et d'ions sulfate (SO_4^{2-}) ce qui entraînent l'acidification locale du sol (Decrée *et al.*, 2013; 2023).

Tableau III. 3. Propriétés physicochimiques des sols.

Relevé floristique		Relevé n°1 (R1)	Relevé n°2 (R2)
pH		$6,63 \pm 0,08$ a	$6,25 \pm 0,02$ b
CE ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$)		$6,24 \pm 0,12$ b	$15,08 \pm 0,04$ a
Humidité (%)		$68 \pm 0,15$ a	$52 \pm 0,25$ b
Texture		Argileux-limoneux	
Concentrations pseudo-totales (mg.kg ⁻¹)	[Fe]	$275712,2 \pm 71195,83$ a	$206636,15 \pm 20520,23$ a
	[Zn]	$4663,64 \pm 1598,07$ a	$3944,05 \pm 861,40$ a
	[Mn]	$7730,75 \pm 1682,37$ a	$7906,23 \pm 6615,93$ a
	[Pb]	$3334,59 \pm 844,48$ a	$3937,13 \pm 888,15$ a
	[Cd]	$12,34 \pm 0,78$ a	$11,32 \pm 3,06$ a
	[As]	$3418,21 \pm 456,89$ a	$2194,93 \pm 582,99$ b
Concentrations biodisponibles par CaCl_2 (mg.kg ⁻¹)	[Fe]	$2,85 \pm 0,01$ a	$2,67 \pm 0,03$ b
	[Zn]	$2,44 \pm 0,26$ a	$1,56 \pm 0,10$ b
	[Mn]	$11,27 \pm 1,37$ b	$32,36 \pm 3,85$ a
	[Pb]	$1,03 \pm 0,01$ a	$0,59 \pm 0,05$ b
	[Cd]	$0,36 \pm 0,03$ a	$0,34 \pm 0,01$ a
	[As]	$0,22 \pm 0,01$ a	$0,21 \pm 0,03$ a

Les lettres indiquent une différence significative selon le test LSD ($p < 0,05$) ($n=3 \pm$ l'écart type).

La conductivité électrique (CE) varie significativement entre les deux sols R1 et R2, passant respectivement de 6,24 à 15,08 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$. Ces sols sont considérés non salins, selon la

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

classification de la FAO (Rhoades *et al.*, 1999). Cette faible salinité pourrait être due à la faible teneur en sels solubles (Tableau III.3).

De même, les taux d'humidité du sol varient également entre humide (52 %) et assez humide (68 %). Ces différences pourraient être liées à la densité et à la couverture végétale, comme le montre la Figure III.3b et c. Cela influence l'ombrage, la respiration ainsi que l'humidité locale (Zhang & Dai, 2022; He *et al.*, 2024). Cependant, la texture des deux sols est de type argileux-limoneux, indiquant la présence importante de particules argileuses. Celles-ci se caractérisent par des fortes surfaces spécifiques, qui pourraient influencer la biodisponibilité des ETM (Que *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024).

Concernant les concentrations pseudo-totales des deux sols, aucune différence significative n'a été observée entre R1 et R2 pour la plupart des éléments étudiés, à l'exception de l'As, dont les teneurs varient de 3418,21 à 2194,93 mg.kg⁻¹ (Tableau III.3). Cette différence pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité géologique du site minier (Ebengue Atega *et al.*, 2022).

Les fractions bioextractibles (par le CaCl₂) ont présenté des valeurs nettement inférieures aux concentrations pseudo-totales (Tableau III.3). Ceci pourrait être dû à la nature minéralogique du site minier de Tamra. À l'exception du Mn, qui a présenté des valeurs légèrement plus élevées, comprises entre 11,27 mg.kg⁻¹ pour R1 et 32,36 mg.kg⁻¹ pour R2. Cette tendance pourrait s'expliquer par la variation significative du pH. En effet, le Mn se trouve principalement dans le sol sous sa forme divalente (Mn²⁺), ce qui augmente sa biodisponibilité en milieu acide (pH < 7) (Hu *et al.*, 2024). En revanche, aucune différence significative n'a été enregistrée pour le Cd et l'As entre les deux relevés. Bien que les concentrations biodisponibles des éléments traces étudiés soient faibles, elles demeurent susceptibles d'être transférées aux plantes.

3.3. Quantification des éléments traces métalliques dans les plantes du site minier de Tamra

La Figure III.6 illustre les concentrations en Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As mesurées dans les organes (parties aériennes et parties racinaires) des six espèces sélectionnées. Des différences significatives ont été observées entre les espèces ($p < 0,05$).

Dans les parties aériennes, les concentrations les plus élevées pour les cinq éléments traces, Fe, Zn, Mn, Pb et As, ont été observées pour *Oxalis pes-caprae* (Figure III.6a, b, c, d et e). Ces résultats confirment son fort potentiel de bioextraction, déjà rapporté dans d'autres travaux

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

(Benhabylès *et al.*, 2020; Clemente-Villalba *et al.*, 2024, Benhabyles *et al.*, 2025). De plus, cette espèce était la seule qui réponde aux critères d’hyperaccumulation de Fe. En effet, elle accumule 20 299,6 µg. g⁻¹ dans sa partie aérienne, ce qui dépasse le seuil d’hyperaccumulation (> 10 000 µg. g⁻¹) (Figure III.6a).

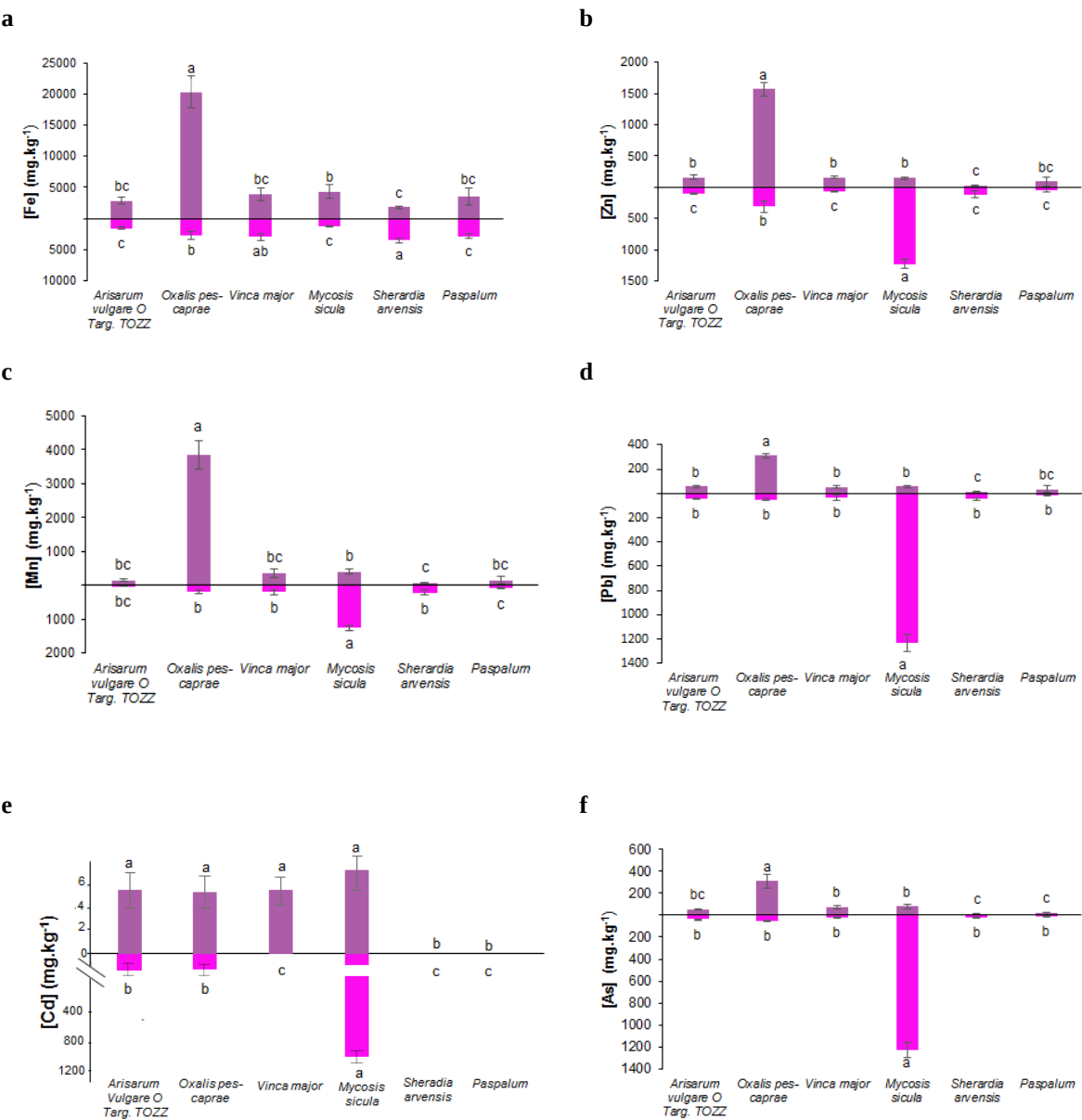


Figure III. 6. Concentration des éléments traces dans les organes des espèces sélectionnées (mg.kg⁻¹, MS : masse sèche) : **a)** fer (Fe), **b)** zinc (Zn), **c)** manganèse (Mn), **d)** plomb (Pb), **e)** cadmium (Cd), et **f)** arsenic (As) : Parties aériennes en violet et parties racinaires en rose. Chaque valeur représente la moyenne ± l'écart type (n = 3). Les lettres indiquent une différence significative (p < 0,05) selon le test LSD.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

En outre, aucune différence n'a été enregistrée pour l'accumulation de Cd dans les parties aériennes des quatre espèces : *Arisarum vulgare* O Targ. TOZZ, *Oxalis pes-caprae*, *Vinca major*, *Myosotis sicula* (Figure III.6e), ce qui suggère un potentiel similaire pour ce métal. Ces espèces concentrent le Cd dans leur racine. Cela pourrait s'expliquer par le développement des mécanismes de confinement limitant son translocation vers leurs parties aériennes (Fasani *et al.*, 2022; Hussain *et al.*, 2024). Cette découverte limite sa bioaccumulation dans les parties racinaires consommées par les herbivores. De même, *Myosotis sicula* a accumulé les concentrations les plus élevées pour Zn, Mn, Pb, Cd et As dans sa partie racinaire (Figure III.6b, c, d, e et f). Ainsi, les racines agissent comme une barrière contre la toxicité de ces polluants. Mais, aucune évaluation n'a été menée à ce jour dans des environnements contaminés par les ETM. Par conséquent, son potentiel comme candidat à la phytoremédiation n'a pas été exploré. Elle représente donc une approche originale et prometteuse. Cependant, l'espèce *Sherardia arvensis* accumule la plus forte concentration de Fe (Figure III.6a).

Afin de mieux interpréter ces résultats, une analyse en composantes principales (ACP) des concentrations des éléments traces étudiés dans les parties aériennes et racinaires a été réalisée. Elle permet d'avoir une lecture synthétique et dynamique des relations et interactions entre ces éléments au sein des plantes. Cette méthode facilite également l'identification des gradients majeurs d'accumulation des ETM.

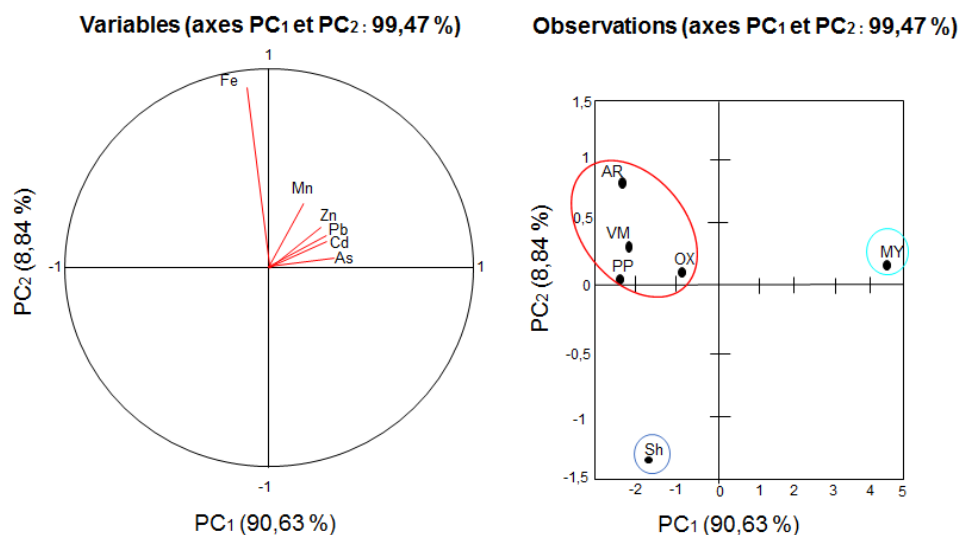
La Figure III.7a présente les résultats de l'ACP appliquée aux concentrations de Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As mesurées dans les racines des six espèces étudiées. Les deux axes représentent 99,47% de la variance totale. Le premier axe (PC₁), qui représente 90,63 % de la variabilité, met en évidence une forte corrélation entre les concentrations de Mn, Zn, Pb, Cd et As, suggérant un effet synergique. Ceci pourrait s'expliquer par les mécanismes physiologiques et biochimiques des plantes favorisant la co-accumulation des éléments étudiés (Yang *et al.*, 2020). De nombreuses études ont montré que ces éléments empruntent des voies de transport similaires, ce qui entraîne une absorption compétitive dans les plantes (Ren *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2023; Panda *et al.*, 2025).

Le second axe (PC₂), qui représente 8,84 % de la variance totale, est associé à l'accumulation de Fe dans les racines. La répartition des espèces dans le plan factoriel (PC₁ × PC₂) reflète leur capacité à accumuler les éléments traces étudiés dans les parties racinaires. Ce plan illustre visuellement la similitude globale entre ces espèces et révèle trois groupes distincts : (1) Le

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

premier est constitué de *Myosotis sicula* (MY), qui se distingue par des concentrations élevées de Zn, Mn, Pb, Cd, et As dans ses racines, reflétant ainsi sa signature d'accumulation multi-éléments traces ; (2) le deuxième groupe rassemble les espèces *Arisarum vulgare* (AV), *Oxalis pes-caprae* (OX), *Vinca major* (VM), et *Paspalum* (PP), espèces modérément accumulatrices des ETM dans leurs racines et (3) le troisième groupe représente le *Sherardia arvensis* (Sh), qui se distingue par sa faible accumulation des éléments traces dans ses racines.

a



b

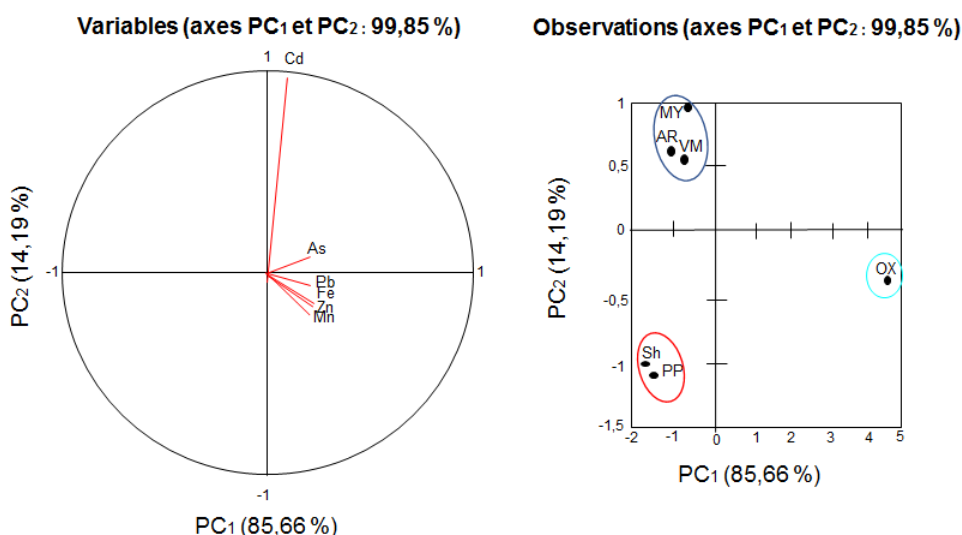


Figure III. 7. Analyses en composantes principales (ACP) des concentrations des éléments traces (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans **a**) les parties racinaires et **b**) les parties aériennes des 6 espèces étudiées : *Arisarum vulgare* O Targ. TOZZ (AR), *Oxalis pes-caprae* (OX), *Vinca major* (VM), *Myosotis sicula* (MY), *Sherardia arvensis* (Sh), *Paspalum* (PP). Les cercles colorés correspondent aux groupes d'espèces végétales.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

La figure III.7b illustre l'ACP effectuée sur les concentrations des mêmes éléments dans les parties aériennes des six espèces étudiées. Les deux axes expliquent 99,85 % de la variance totale. Le premier axe (PC₁), qui représente 85,66 % de la variabilité, traduit une forte corrélation entre le Mn, le Zn, le Pb, le Fe et l'As, suggérant un effet synergique, suggérant à nouveau que ces éléments peuvent emprunter des voies de transport similaires au sein de la plante, notamment à travers des transporteurs membranaires (Jogawat *et al.*, 2021; Das *et al.*, 2022) ou par le complexe xylème-phloème (Zhou *et al.*, 2023; Balagopal *et al.*, 2025), ce qui favorise leur accumulation commune dans les parties aériennes. Par ailleurs, certains métaux tels que le Zn et le Mn sont des nutriments essentiels, dont l'absorption active peut entraîner la co-absorption d'éléments toxiques similaires tels que le Pb et l'As (Shen *et al.*, 2020; Varshney *et al.*, 2021). Cette co-absorption, combinée à des facteurs environnementaux et physiologiques communs, contribue à la forte corrélation observée entre les concentrations de différents ETM dans la plante.

Le second axe (PC₂), qui représente 8,84 % de la variance totale, est associé principalement à l'accumulation de Cd dans les parties aériennes. La répartition des espèces dans le plan factoriel (PC₁ × PC₂) montre la présence de trois groupes d'espèces : (1) le premier représente *Oxalis pes-caprae* (OX), qui se distingue par les concentrations les plus élevées de Fe, Zn, Mn, Pb et As dans ses parties aériennes, traduisant sa capacité particulière à accumuler de ces éléments. Cette capacité d'accumulation des multi-éléments est déjà soulignée dans plusieurs études : par Benhabylès *et al.* (2020) qui ont rapporté des teneurs élevées en Pb et As dans ses parties aériennes ; par Clemente-Villalba *et al.* (2024) qui ont montré également l'accumulation de Mn, Zn et Fe dans ses parties aériennes et par Benhabyles *et al.* (2025) ont montré son potentiel de phytoextraction de Cd. Ces résultats soulignent le fort potentiel d'*Oxalis pes-caprae* pour la phytoremédiation des sites contaminés par les éléments traces. (2) Le deuxième regroupe *Arisarum vulgare* (AV), *Myosotis sicala* (MY) et *Vinca major* (VM), espèces qui se distinguent par des concentrations les plus élevées de Cd dans leurs parties aériennes et qui présentent une accumulation modérée des autres éléments traces étudiés. Certaines espèces de genre *Vinca*, notamment *Vinca rosea* ont attiré l'attention pour leur capacité de phytoremédiation grâce à leur potentiel unique à hyperaccumuler les ETM, en particulier le Cd (Hashim *et al.*, 2024). Enfin, (3) le troisième groupe rassemble les espèces *Paspalum* (PP) et *Sherardia arvensis* (Sh), qui se distinguent par leur faible accumulation des éléments traces dans leurs parties aériennes.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Ces résultats mettent en évidence des profils contrastés d'accumulation et justifient l'évaluation complémentaire des indices de translocation et de bioconcentration afin de mieux cerner le potentiel de phytoremédiation de ces espèces.

3.4. Évaluation de la bioaccumulation et de la translocation des éléments traces dans les espèces étudiées

Le tableau III.4 et la figure III.8 présentent les facteurs de bioconcentration (FBC) et de translocation (FT) pour le Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As des espèces étudiées. Ces indices ont été utilisés pour évaluer l'efficacité d'accumulation des ETM dans les plantes et estimer leur potentiel de phytostabilisation et/ou de phytoextraction (Usman *et al.*, 2020; Luc *et al.*, 2022). Les résultats obtenus ont montré une variation entre les espèces végétales et les éléments traces étudiés (Tableau III.3). Les facteurs de bioconcentration de tous les éléments traces étudiés dépassent 5 pour l'ensemble des espèces examinées, indiquant un fort potentiel d'accumulation des ETM à partir des sols miniers de Tamra. Cependant, les espèces *Paspalum* et *Sherardia arvensis* constituent une exception remarquable pour le cadmium (BCF = 0 ; FT = 0) (Tableau III.3). La plupart des espèces étudiées ont démontré un FT supérieur à 1, indiquant leur capacité à transloquer le Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As des racines vers les parties aériennes (Figure III.8). En revanche, seul *Arisarum vulgare* a montré sa capacité à transférer le Cd vers sa partie supérieure (BCF > 30 ; FT > 1). Cependant, cette espèce représente un potentiel de phytostabilisation pour le Mn (BCF > 20 ; FT < 1) (Tableau III.4 ; Figure III.8). En outre, les trois espèces *Oxalis pes-caprae*, *Vinca major* et *Paspalum* ont montré une bonne capacité de phytoremédiation de cinq éléments traces (Fe, Zn, Mn, Pb et As). Parmi elles, *Oxalis pes-caprae* est apparue comme l'espèce la plus efficace sur le site minier de Tamra pour la phytoextraction du Fe, Mn, Pb et As, avec des facteurs de translocation de 7,80 (BCF = 8048), 20,32 (BCF = 363,7), 6,12 (BCF = 352,6), et 6,03 (BCF = 1571) respectivement. Cependant, une exception a été observée pour le Cd (FT < 1 ; BCF = 31), soulignant la capacité de cette plante à accumuler principalement ce métal dans ses racines illustrant son potentiel de phytostabilisation. Ces résultats contredisent l'étude de Benhabyles *et al.*, (2025) qui suggéraient son potentiel pour éliminer le Pb du sol et favoriser la phytoextraction du Cd. Ces divergences peuvent s'expliquer par la variation des propriétés physicochimiques du sol, du niveau de contamination des sites, ainsi que de la stratégie d'adaptation et de l'interaction avec

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

leur environnement. Par ailleurs, *Paspalum* a montré sa forte capacité de phytoextraction pour le zinc, comme l'indique sa valeur de FT élevée (FT = 4,7 ; BCF = 86,4) (Tableau III.4 ; Figure III.8). Bech *et al.*, (2002) ont constaté également le potentiel de cette espèce pour la phytoextraction de Zn et As.

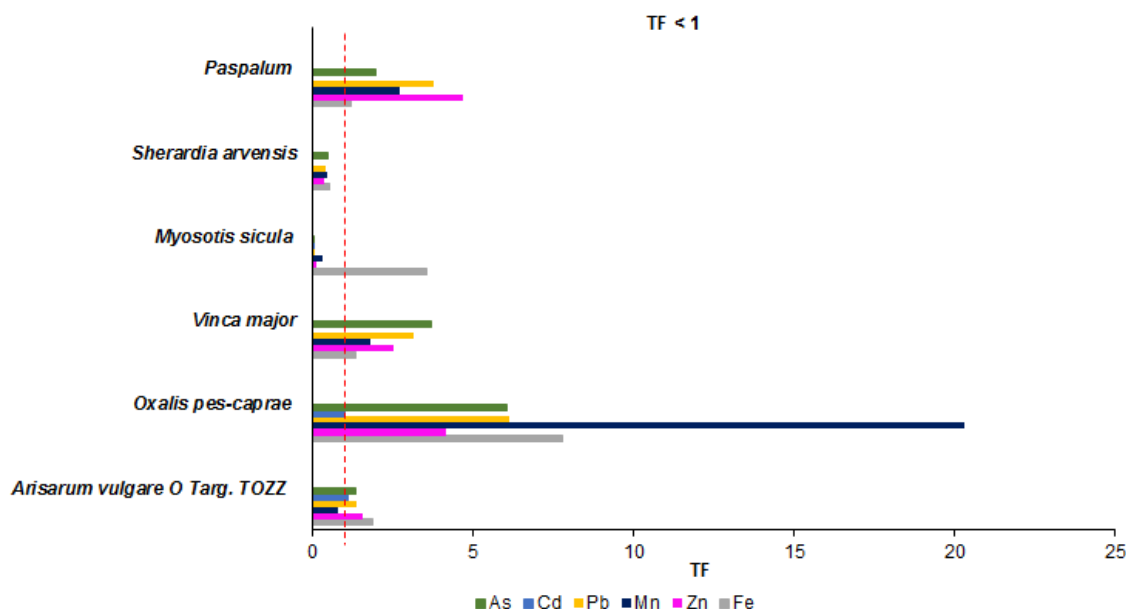


Figure III. 8. Facteurs de translocation des espèces végétales étudiées.

En revanche, les valeurs du facteur de translocation pour les espèces *Myosotis sicula* et *Sherardia arvensis* sont inférieures à 1 pour la plupart des éléments, ce qui indique leurs capacités de phytostabilisation de ces éléments (FT < 1 ; BCF > 50). Cependant, une exception a été observée pour le fer avec *Myosotis sicula* (FT = 3,56 ; BCF > 2082,6), suggérant son potentiel de phytoextraction pour cet élément.

Ces résultats suggèrent que la plupart des espèces étudiées possèdent une double fonctionnalité : elles peuvent assurer la phytoextraction de certains éléments tout en jouant un rôle de phytostabilisation pour d'autres.

À l'exception de *Sherardia arvensis* qui montre une capacité exclusive de phytostabilisation pour tous les éléments. Cette double fonctionnalité rend ces espèces particulièrement intéressantes pour les futurs programmes de phytoremédiation sur le site minier de Tamra. Enfin, *Oxalis pes-caprae* constitue une exception remarquable car cette espèce présente une forte capacité d'hyperaccumulation de Fe, avec des concentrations dans sa partie aérienne qui

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

dépassent largement le seuil d'hyperaccumulation reconnu ($> 20\,000\ \mu\text{g. g}^{-1}$) (Figure III.6a). Cependant, certaines limites doivent être mentionnées et prises en compte notamment : *i*) le faible nombre de relevés, *ii*) l'absence de réplifications temporelles, et finalement *iii*) le choix restreint de méthodes analytiques.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Tableau III. 4. Facteur de bioconcentration des espèces végétales étudiées.

	BCF					
	Fe	Zn	Mn	Pb	Cd	As
<i>Arisarum vulgare</i> O Targ. TOZZ	1733,20 ± 440,54 b	112,77 ± 14,80 c	29,28 ± 6,44 bc	102,81 ± 18,29 c	31,19 ± 2,66 b	422,23 ± 83.95 c
<i>Oxalis pes-caprae</i>	8048,10 ± 824,26 a	771,77 ± 75,18 b	363,75 ± 59,02 a	352,66 ± 20,84 b	31,02 ± 1,99 b	1570,99 ± 288,10 b
<i>Vinca major</i>	2458,80 ± 325,44 b	98,62 ± 20,46 c	52,56 ± 1,92 b	92,16 ± 18,73 c	20,74 ± 9,41b	462,25 ± 11,66 c
<i>Mycosis sicula</i>	2082,60 ± 397,96 b	881,47 ± 75,31 a	52,45 ± 10,43 b	2181,80 ± 286,65 a	3507,30 ± 262,19 a	6261,90 ± 1064,70 a
<i>Sherardia arvensis</i>	1991,90 ± 73,63 b	94,78 ± 27,41 c	9,04 ± 1,93 bc	104,14 ± 5,83 c	0 ± 0 c	147,83 ± 12,10 d
<i>Paspalum</i>	1703,50 ± 696,13 b	86,45 ± 32,14 c	7,11 ± 2,69 c	83,20 ± 55,26 c	0 ± 0 c	129,24 ± 74,24 d

Les lettres indiquent une différence significative selon le test LSD (p < 0,05) (n=3 ± l'écart type).

4. Conclusion et perspectives

Cette étude a caractérisé la biodiversité végétale et le potentiel de phytoremédiation d'un minéral de fer au Nord de la Tunisie. Les principaux résultats révèlent une faible diversité végétale, avec seulement 23 espèces recensées appartenant à 18 familles taxonomiques. Parmi elles, plusieurs taxons, notamment *Arisarum vulgare*, *O. Targ. Tozz*, *Oxalis pes-caprae*, *Vinca major*, *Myosotis sicula*, *Sherardia arvensis*, *Paspalum* sp. se distinguent par leur adaptabilité physiologique et écologique aux conditions contraignantes du site minier. Leur fort taux de recouvrement et leur capacité à prospérer dans un sol contaminé désignent ces taxons comme des candidats prometteurs pour des applications de phytoremédiation. Parmi ces taxons, une plus grande attention pourrait être accordée sur deux espèces remarquables : (1) *O. pes-caprae* pour sa grande capacité d'hyperaccumulation du Fe et (2) *M. sicula* pour son fort potentiel à stabiliser dans sa partie racinaire la plupart des éléments étudiés. Ainsi, *M. sicula* semble être un candidat intéressant pour un programme de restauration écologique du site minier de Tamra en association avec une espèce forestière tolérante.

Ces résultats ouvrent des perspectives prometteuses en matière de phytoremédiation, mais ils ne doivent pas occulter les limites de notre étude : (1) il faut noter que d'autres procédés de mesure des ETM phytodisponibles dans le sol minier de Tamra seraient nécessaires pour confirmer les résultats obtenus, notamment par l'utilisation de méthodes spécifiques telles que l'extraction au NH_4NO_3 ou l'extraction séquentielle qui permettrait de consolider les observations faites ; (2) par ailleurs, comme la variabilité génétique intra-espèce n'a pas été évaluée dans cette étude, elle pourrait avoir une influence sur les capacités observées. et (3) enfin, en l'absence de mesures de protection du site et compte tenu de la présence de bétail en pâturage, des actions urgentes de stabilisation des éléments traces étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) apparaissent indispensables pour limiter leur dissémination et réduire les risques environnementaux. Plusieurs axes de recherche et d'action méritent ainsi d'être envisagés :

1. Approfondir l'évaluation de la biodisponibilité des ETM : recourir à des méthodes complémentaires permettrait de mieux cerner la fraction réellement accessible aux plantes et de comparer la pertinence de ces indicateurs pour prédire l'absorption.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

2. Élargir l'échantillonnage et la temporalité des relevés : la réalisation de suivis multi-saisonniers (hiver/été) et sur plusieurs années permettrait de prendre en compte la variabilité interannuelle et intra-spécifique, notamment la diversité génétique au sein des populations locales.
3. Évaluer les mécanismes physiologiques et moléculaires d'adaptation : des études ciblées sur les voies de transport, l'expression de gènes liés à la tolérance aux métaux et les mécanismes de séquestration intracellulaire renforceraient la compréhension du potentiel phytoremédiateur des espèces identifiées.
4. Explorer les synergies écologiques : l'association d'espèces aux stratégies complémentaires (phytoextraction vs phytostabilisation) pourrait constituer une approche mixte de remédiation, favorisant à la fois l'élimination et l'immobilisation des ETM.
5. Intégrer la dimension sanitaire : la présence de bétail pâturent sur le site souligne l'urgence de mener des études de bioaccumulation dans les produits animaux et d'évaluer le transfert effectif des métaux le long de la chaîne alimentaire. Ces données sont cruciales pour établir une évaluation complète du risque pour les populations locales.
6. Développer des stratégies de gestion et de restauration : au-delà des aspects scientifiques, des mesures de protection physique (clôtures, restriction du pâturage), combinées à des pratiques de réhabilitation écologique (plantation d'espèces tolérantes, amendements organiques ou minéraux), sont nécessaires pour limiter la dissémination des ETM et améliorer durablement la qualité des sols.

En définitive, cette étude fournit une première photographie du potentiel phytoremédiateur de la flore endémique du site minier de Tamra. Si elle met en évidence des espèces prometteuses, elle doit être considérée comme un point de départ plutôt que comme une réponse définitive. Seule une approche intégrée – associant suivis écologiques, analyses géochimiques, approches physiologiques et évaluation sanitaire – permettra de concevoir des programmes de phytoremédiation réellement efficaces et adaptés aux réalités locales.

2^{ème} partie : Évaluation de l'exposition de la population locale aux éléments traces métalliques et analyse des risques sanitaires associés

1. Introduction

Le secteur minier constitue un pilier important du développement économique dans de nombreux pays. Toutefois, ses activités génèrent souvent des niveaux élevés d'éléments traces métalliques (ETM) dans l'eau, l'air, les sols et la chaîne alimentaire, provoquant ainsi des impacts majeurs sur l'environnement et la santé publique. En effet, plusieurs études ont révélé la présence d'ETM à des niveaux préoccupants dans le sang des populations vivant à proximité des sites miniers (Hong *et al.*, 2014; Obiri *et al.*, 2016; Surenbaatar *et al.*, 2023). Ces constats soulignent la nécessité pour le secteur minier d'intégrer davantage des stratégies axées sur la durabilité environnementale et la prévention des risques sanitaires.

La mine à ciel ouvert de Tamra renferme un minerai de fer à composition polymétallique. L'hétérogénéité de cette minéralisation favorise implique la présence significative d'ETM, dont la mobilité est étroitement liée à divers processus chimiques et minéralogiques, tels que la formation de complexes stables avec la matière organique ou les oxydes métalliques, des phénomènes de coprécipitation avec d'autres minéraux, ainsi que l'adsorption sur les particules du sol (§ 2.1) (Decrée *et al.*, 2009, 2010; Feng *et al.*, 2007). Sous le climat méditerranéen, les processus d'érosion éolienne et hydrique peuvent être accentués, favorisant ainsi la dispersion et l'infiltration de ces polluants, depuis les sols contaminés ou issus de l'activité minière vers les environnements adjacents. La présence d'ETM associés aux aérosols, en particulier aux fractions PM₁₀ (particules dont la taille est inférieure à 10 µm) ou PM_{2,5} (particules dont la taille est inférieure à 2,5 µm) constitue un risque sanitaire pouvant être à l'origine d'affections respiratoires et favoriser le transport systémique de ces éléments traces dans l'organisme (Xing *et al.*, 2016).

Par ailleurs, le site minier de Tamra se caractérise par un relief accidenté et un réseau hydrographique dense. Cette configuration géomorphologique facilite le transfert sur de longues distances des ETM, notamment ceux présents sous forme dissoute ou colloïdale, augmentant ainsi leur potentiel de dissémination dans l'environnement (Figure III.9).

Chapitre III. Impacts écotoxikologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

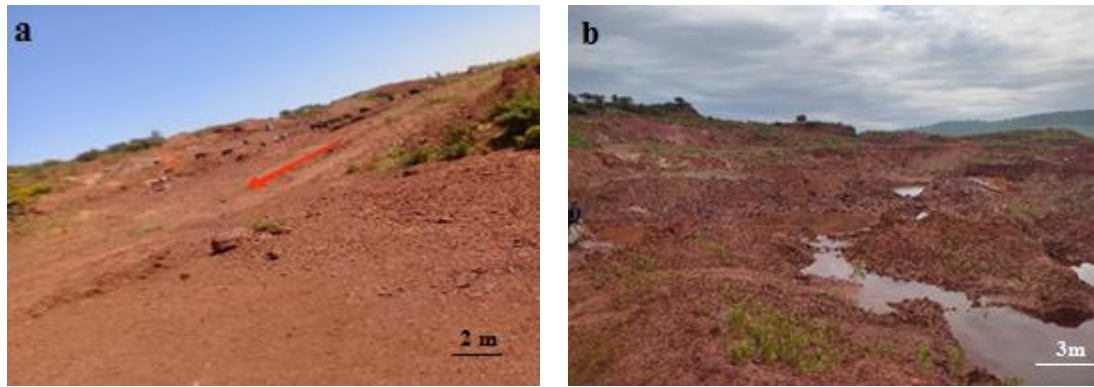


Figure III. 9. Topographie du site minier de Tamra : **a)** Pente du site : la flèche rouge correspond à sa direction vers le nord ; **b)** Flux des eaux de ruissellement : (AO©).

De plus, la consommation de l'eau potable provenant de trois sources naturelles (Aïn El Mota, El Bell et Aïn Rechech) présentes au sein du site minier, ainsi que de denrées alimentaires cultivées sur des sols contaminés et de produits d'origine animale exposés aux éléments traces, constitue une voie directe d'ingestion de ces polluants. La toxicité est accrue et exacerbée par la bioaccumulation de ces polluants dans la chaîne alimentaire, un phénomène amplifié par les conditions environnementales locales.

En outre, le contact cutané avec les sols ou les eaux contaminées représente une voie d'exposition supplémentaire, en particulier pour les travailleurs miniers opérant sans équipement de protection adapté, et ce risque est accru en présence de lésions cutanées. Par ailleurs, les résidents nous ont informés que les enfants jouaient régulièrement avec les sols, alors que les femmes enceintes et allaitantes participaient aux activités agricoles et recueillaient l'eau des sources pour leur consommation quotidienne, malgré l'absence de protection. Ainsi, les conséquences sanitaires d'une exposition chronique aux ETM sont multiples et peuvent se traduire par (1) des atteintes rénales, telles que des syndromes glomérulaires, une insuffisance rénale et des lésions tubulaires ; (2) des troubles neurologiques de type neuropathies périphériques, troubles cognitifs, troubles psychiatriques et troubles du développement neurologique, (3) des troubles respiratoires comme l'asthme, la bronchite chronique, la fibrose pulmonaire, et (4) des troubles cutanés tels que des dermatoses, de l'eczéma et des irritations (Xie *et al.*, 2022; Islam *et al.*, 2023; Bjørklund *et al.*, 2025).

Bien que la situation actuelle du site minier de Tamra soit préoccupante, aucune étude n'a été réalisée pour évaluer les risques sanitaires dans cette zone, rendant cette étude d'autant plus

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

importante. Ce travail pourrait constituer une base de données sur les risques sanitaires associés à l'activité minière de Tamra et ouvrir de nouvelles pistes de recherches pour la gestion de ce site. Ainsi, trois hypothèses ont été soulevées :

- (1) L'activité minière de Tamra affecte la qualité du réseau hydrique du site en perturbant ses caractéristiques physicochimiques et toxicologiques, ce qui accroît la vulnérabilité de l'écosystème aquatique et perturbe la chaîne alimentaire locale ;
- (2) La bioaccessibilité des éléments traces étudiés en phase gastrique est significativement plus élevée dans les zones plus contaminées du site minier de Tamra ;
- (3) La contamination de ce site peut entraîner des risques cancérogènes pour la population locale, en particulier les enfants, en raison de leurs développements physique et comportemental ;

Les objectifs généraux de cette étude ont consisté à : (1) évaluer la qualité du milieu aquatique sur le site minier de Tamra, et (2) estimer les risques sanitaires associés à la présence des principaux ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans les sols, dans le but de proposer des orientations pour les actions de prévention et de sécurité.

De manière spécifique, cette recherche visait à :

- Caractériser la qualité physicochimique et toxicologique des eaux de surface et des eaux de source destinées à la consommation dans la région de Tamra ;
- Déterminer la fraction bioaccessible dans la phase gastrique des ETM dans les sols miniers de Tamra ;
- Évaluer les risques sanitaires cancérogènes et non cancérogènes, pour les populations adultes et infantiles exposées ;

2. Matériel et méthodes

2.1. Échantillonnages et analyses physicochimiques des eaux et des sols

La méthode d'échantillonnage et les concentrations des éléments traces métalliques des sols utilisés dans cette étude ont été initialement décrites dans l'article (§ 2.1).

La campagne d'échantillonnage de l'eau de source et de l'eau de surface a été réalisée en juin 2024 en différents points du site minier de Tamra afin d'évaluer le taux de pollution métallique. Pour ce faire, un total de cinq échantillons d'eau a été prélevé : Deux échantillons d'eau de surface (ER1 et ER2), prélevés à l'aide d'une canne dans deux zones de drainage où convergent les eaux de ruissellement du site minier (Figure III.10). La première zone (ER1) a été située à

Chapitre III. Impacts écotoxiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

proximité du site T3 à 37° 3' 26.86" N, 9°6'19.25" E alors que la seconde (ER2) a été localisée à proximité du site T6 à 37°3'12.19"N, 9°6'2.73"E. Afin de garantir un échantillon représentatif, les prélèvements ont été effectués de 0 à 10 cm de profondeur sous la couche de surface (MDDELCC, 2014). Cette profondeur permet d'éviter de prélever l'eau exposée directement à l'air, susceptible de s'oxyder, ainsi que les particules plus denses susceptibles de se déposer au fond.

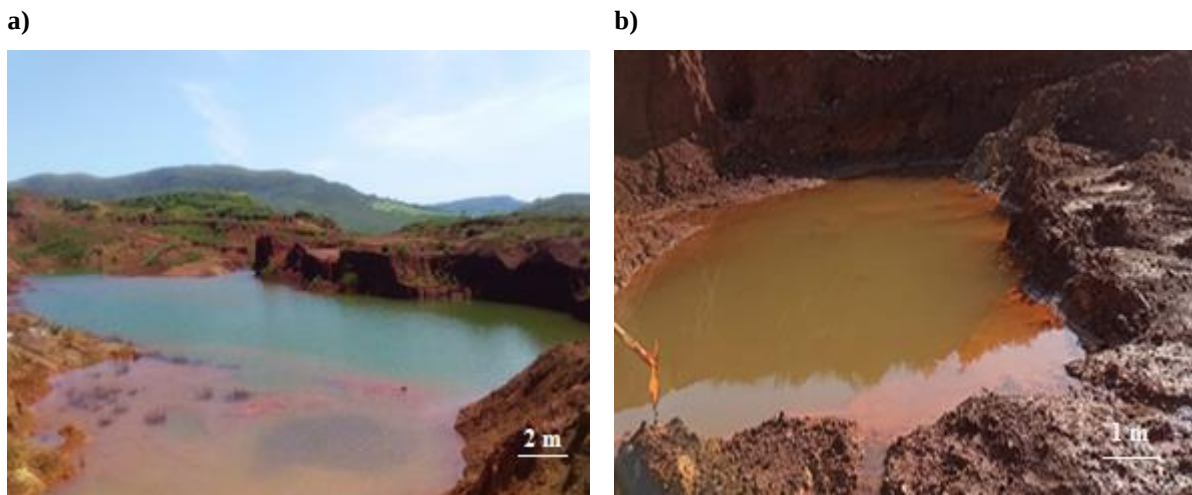


Figure III. 10. Zones de drainage minier : **a)** eau de surface (ER1); **b)** eau de surface (ER2). (AO©).

Les trois échantillons d'eaux potables naturelles (issues de sources) destinées aux communautés locales : Aïn El Bell, Aïn El Mota et Aïn El Rechech (Figure III.11). La source Aïn El Bell est située au sud de la mine, celle d'Aïn El Mota se trouve près de la zone manganifère, tandis que la source d'Aïn El Rechech est située dans la zone dite « Rechech », à l'extrémité ouest de la mine (Figure III.2).

Chapitre III. Impacts écotoxiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales



Figure III. 11. Eaux de source : **a)** Aïn El Bell ; **b)** Aïn El Mota ; **c)** Aïn El Rechech. (AO©).

Les échantillons ont été prélevés dans des bouteilles en verre stériles d'une capacité d'un litre. Pour garantir la précision de la quantification de la fraction dissoute des ETM analysés, les eaux de surface (ER1 et ER2) ont été filtrées à l'aide de membranes Millipore de 0,45 μm . Cette étape permet d'éviter la solubilisation de certains éléments pendant le stockage (Pérez-Sirvent *et al.*, 2016; Cleaver *et al.*, 2021) assurant ainsi la fiabilité des mesures subséquentes. Tous les échantillons ont été réalisés en triple, conformément à la méthode décrite par Rodier *et al.* (1996).

La mesure des paramètres physico-chimiques a été réalisée *in situ*. Le pH et la conductivité électrique (CE) ont été déterminés à l'aide de pH-mètre et conductimètre portables (modèles HI 99121 et HI 99300, HANNA Instruments, États-Unis) préalablement étalonnés. Les échantillons ont été ensuite acidifiés par quelques gouttes d'acide nitrique à 2 % conformément à la norme NF EN ISO 5667-1 (2007), afin d'assurer leur conservation, puis transportés au laboratoire dans des glacières isothermes et conservés à 4°C jusqu'à leur analyse. Les concentrations en Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As ont été finalement déterminées par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, CL, USA).

2. 2. Indice de qualité de l'eau (IQE)

L'indice de qualité de l'eau (IQE) a été calculé afin d'évaluer le degré de pollution globale des échantillons d'eau par les ETM ciblés dans cette étude. Cette méthode, proposée par Mohan *et*

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

al. (1996), repose sur une approche arithmétique pondérée. L’indice (IQE) a été calculé à partir des poids unitaires (Wi), des sous-indices et des normes recommandées par l’OMS (Si) selon les formules suivantes (Rakotondrabe *et al.*, 2017; Djade *et al.*, 2020) :

$$Wi = \frac{k}{Si}$$

$$k = \left(1 \middle| \frac{1}{Si}\right)$$

$$Qi = 100 \times Vi/Si$$

$$IQE = (\sum_{i=1}^n Wi \times Qi \mid \sum_{i=1}^n Wi)$$

Où Wi : le poids attribué à chaque élément compris entre 0 et 1 ; k : la constante de proportionnalité ; Vi : la concentration de chaque élément ; Si : norme standard ou seuil environnemental selon la norme recommandée par l’OMS ; Qi : échelle d’évaluation de la qualité de chaque élément ; n : nombre de paramètres. Cinq catégories de qualité sont identifiées en fonction des valeurs de l’IQE (Tableau III.5) :

Tableau III. 5. Classification selon l’indice de qualité de l’eau (Aher *et al.*, 2016).

Catégories de IQE	Type d’eau	Usage possible
0 - 25	Excellente qualité	Eau potable, irrigation, et industrie
>25 - 50	Bonne qualité	Eau potable, irrigation, et industrie
>50 - 75	Mauvaise qualité	Irrigation et industrie
>75 - 100	Très mauvaise qualité	Irrigation
>100	Eau non potable	Traitement approprié requis avant utilisation

Afin d'évaluer les effets réels des eaux testées du site minier de Tamra sur des organismes vivants, il est nécessaire de mener des tests biologiques tels que des tests de germination.

2.3. Test de toxicité & de bioaccessibilité (phase gastrique)

2.3.1. Test de phytotoxicité

Dans le cadre de cette étude, des graines de cresson (*Lepidium sativum*) ont été sélectionnées comme bioindicateur pour évaluer la phytotoxicité des échantillons des eaux de surface et des

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

eaux de sources (Marciulioniene *et al.*, 2005). Cette espèce est caractérisée par sa croissance rapide et sa sensibilité aux polluants, ce qui en fait un indicateur de qualité de l'environnement testé. Ces graines, issues d'un matériel commercial certifié (n° PL-EKO-01) ont été soigneusement sélectionnées selon des critères de couleur et de vigueur, tandis que celles endommagées ont été rejetées. Le test a été réalisé dans des boîtes de Petri en polystyrène de 65 mm de diamètre. Dix graines ont été distribuées uniformément sur les papiers filtres imbibés par 3 ml d'eau testée (AB, AM, AR, ER1, et ER2) ou par de l'eau distillée stérile (témoin). Les boîtes ont été ensuite scellées avec du Parafilm™ puis incubées pendant 72 heures dans une chambre de culture à l'obscurité ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Au total, 30 graines ont été testées par modalité. À l'issue de la période d'incubation, le nombre de graines germées a été dénombré. Parallèlement, les longueurs des hypocotyles et des racines ont été mesurées pour chaque plantule. Le pourcentage de germination des graines (G %), l'indice de germination (GI %), l'indice de vigueur (SVI), le taux de germination relative des racines des plantules de *L. sativum* (GRR) et le taux de croissance relative des racines (CRR) ont été calculés comme suit :

$$G (\%) = \left(\frac{\text{Nombre des graines germées}}{\text{Nombre des graines testées}} \right) \times 100$$

$$GI (\%) = (GRG \times RRG) \div 100$$

$$SVI = G (\%) \times \text{longueur des plantules}$$

$$GRR(\%) = \left(\frac{SE}{SC} \right) \times 100$$

$$CRR (\%) = \left(\frac{RE}{RC} \right) \times 100$$

Où : SE : nombre des graines germées dans l'eau testée ; SC : nombre des graines germées dans l'eau distillée ; RE : longueur des racines après germination dans l'eau testée ; RC : longueur des racines après germination dans l'eau distillée.

En complément de l'évaluation écotoxicologique du milieu aquatique, la quantification de la biodisponibilité des ETM présents dans les sols de la zone d'étude s'avère nécessaire pour une appréciation plus juste des risques sanitaires associés au site minier de Tamra.

2.3.2. Test de bioaccessibilité (phase gastrique)

Afin d'évaluer la biodisponibilité des éléments traces issus des sols miniers de Tamra au niveau du tube digestif humain, un test de bioaccessibilité gastrique simplifié (SBET, « Simple

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Bioaccessibility Extraction Test ») a été mis en œuvre. Conformément à la méthode décrite par Mendoza *et al.*, (2017), les 9 sols testés ont été mélangés à une solution de glycine à 0,4 mol.L⁻¹ ajustée à un pH de 1,5 avec de l'acide chlorhydrique (37 %) selon un ratio solide /liquide de 1 :100 (m/v). Après une incubation d'heure sous agitation à 37 ± 1 °C, 10 ml de la solution extraite ont été prélevés et centrifugés pendant 270 secondes à 6000 tr/mn. Le surnageant a ensuite été filtré à travers une membrane de 0,45 µm à l'aide d'un filtre à seringue, puis conservé à 4°C jusqu'à l'analyse. Ces échantillons ont été ensuite analysés par ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, CL, USA).

En complément des tests précédemment réalisés, il est essentiel d'évaluer les risques sanitaires afin de mettre en évidence les conséquences potentielles des éléments traces présents dans les sols miniers de Tamra sur la santé humaine.

2.4. Estimation des risques sanitaires

L'évaluation des risques sanitaires vise à estimer la probabilité et les modalités selon lesquelles les éléments traces présents dans le sol peuvent affecter la santé humaine. Dans la présente étude, cette approche a été utilisée pour évaluer les risques cancérogènes et non cancérogènes chez les adultes et les enfants, en particulier ceux fréquentant l'école primaire « mine de Tamra », située à 850 m de la mine.

2.4.1. Estimation de l'exposition aux ETM

Cette étude repose sur la prise en compte de l'exposition humaine au sol minier (< 63 µm) par trois voies différentes : (1) l'ingestion orale de particules de sol, (2) l'inhalation de particules de sol par voies buccale et nasale et (3) l'absorption cutanée des éléments traces présents dans les sols sur la peau. Les doses quotidiennes chroniques (DQC, mg/kg/jour) ont été calculées comme suit (USEPA, 1989; 2002) :

$$\begin{aligned} DQC_{ing} &= \frac{C \times T_{ing} \times DE \times FE}{PCM \times TM} \times FC \\ DQC_{inh} &= \frac{C \times T_{inh} \times DE \times FE}{PCM \times TM \times FEP} \\ DQC_{dermal} &= \frac{C \times SC \times FAC \times FAD \times DE \times FE}{PCM \times TM} \times FC \end{aligned}$$

Où : C : concentration des éléments traces dans le sol (mg.kg⁻¹); T_{ing} : taux d'ingestion (mg.jour⁻¹) ; T_{inh} : taux d'inhalation (mg.jour⁻¹); DE : durée d'exposition (ans) ; FE : fréquence d'exposition (gjours.an⁻¹); FC : facteur de conversion (kg.mg⁻¹) ; FEP : facteur d'émission de

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

particules ($\text{m}^3.\text{kg}^{-1}$) ; SC : surface cutanée exposée (cm^2) ; FAD : facteur d'absorption cutanée ; FAC : facteur d'adhérence cutanée ; PCM : poids du corps moyen (kg); TM : temps moyen pour les substances cancérogènes ou non cancérogènes (jours). Toutes les valeurs utilisées sont reportées dans le Tableau III.6.

Tableau III. 6. Valeurs de référence des paramètres utilisés (USEPA, 1989 ; 2002 ; DEA, 2010).

Paramètres	Unités	Adultes	Enfants
Ting	mg.jour^{-1}	100	200
DE	ans	30	6
FE	Jours.an^{-1}	365	365
PCM	kg	70	15
TM Cancérogène	Jours	25550	25550
Non cancérogène		10950	2190
FEP	$\text{m}^3.\text{kg}^{-1}$	$1,3.10^9$	$1,3.10^9$
SC	cm^2	5800	2100
FAC	-	0,1	0,1
FC	kg.mg^{-1}	1.10^{-6}	1.10^{-6}

2.4.2. Estimation des risques non cancérogènes

Le quotient de risque (QR) a été utilisé pour estimer le risque non cancérogène. Il correspond au rapport entre la dose quotidienne chronique (DQC, mg/kg/jour) et la dose de référence (DRf, mg/kg/jour) (Tableau III.7) pour chaque élément trace étudié (USEPA, 1989).

$$QR = \frac{DQC}{DRf}$$

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Tableau III. 7. Doses de référence (DRf) et facteurs de pente (FP) des éléments traces étudiés (USEPA, 1989, 2002 ; DEA, 2010 ; Luo *et al.*, 2012, Oyebamiji *et al.*, 2024).

Éléments traces	DRf (mg/kg/jours)			FP (mg/kg.jours) ⁻¹		
	Ingestion	Inhalation	Dermal	Ingestion	Inhalation	Dermal
Fe	1,6	-	-	-	-	-
Mn	1,4. 10 ⁻¹	-	-	-	-	-
Zn	3,0. 10 ⁻¹	-	7,5. 10 ²	-	-	-
Pb	3,5. 10 ⁻³	-	-	8,5. 10 ³	4,20. 10 ³	-
Cd	5,0. 10 ⁻⁴	5,7. 10 ⁵	5,0. 10 ⁴		6,3	-
As	3,0. 10 ⁻⁴	3,0. 10 ⁴	3,0. 10 ⁴	1,5	15	1,5

- : Aucune valeur disponible.

Les risques potentiels non cancérogènes ont été ensuite évalués à l'aide de l'indice de dangerosité (ID), qui correspond à la somme des valeurs QR pour les trois voies d'exposition.

$$ID = \sum QR_{\text{ingestion}} + QR_{\text{inhalation}} + QR_{\text{dermal}}$$

2.4.3. Estimation des risques cancérogènes

Le risque cancérogène correspond à la probabilité qu'un individu développe un cancer à la suite d'une exposition aux ETM présents dans le sol (USEPA, 1989, 2002 ; Adimalla, 2020). Ce risque est calculé en multipliant la dose quotidienne chronique (DQC) par le facteur de pente de chaque élément testé (Tableau III.6) :

$$RC = DQC \times FP$$

Ainsi, le risque cancérogène total (RCT) a été calculé à partir de la somme des valeurs RC pour les trois voies d'exposition :

$$RCT = \sum RC_{\text{ingestion}} + RC_{\text{inhalation}} + RC_{\text{dermal}}$$

Selon l'USEPA (1989), les valeurs de RC et RCT inférieures à 1.10⁻⁶ sont considérées comme négligeables, tandis que celles supérieures à 1.10⁻⁴ sont jugées potentiellement dangereuses pour la santé humaine.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation des eaux de surface et des sources du site minier de Tamra

Les analyses physicochimiques des cinq échantillons d'eau à savoir deux échantillons de surface (ER1 et ER2) et trois échantillons d'eau potable naturelle (Aïn El Bell (AB), Aïn El Mota (AM), Aïn El Rechech (AR)) révèlent des différences notables (Tableau III.8). Les valeurs de pH et de la conductivité électrique varient de manière significative ($p < 0,05$). Selon la classification de la norme NF EN ISO 10523 (2012), les eaux potables provenant d'Aïn El Bell (AB) et d'Aïn El Rechech (AR) sont acides ($5,5 < \text{pH} \leq 6,5$) et sont par conséquent considérées comme étant de mauvaise qualité, alors que l'eau potable provenant d'Aïn El Mota (AM) est neutre à légèrement alcaline ($6,5 \leq \text{pH} \leq 8,5$). Cette source est classée dans la catégorie recommandée par l'OMS (2006). Les eaux de surface ER1 ($\text{pH} = 5,48$) et ER2 ($\text{pH} = 2,63$) sont jugées fortement acides ($\text{pH} < 5,5$), similaires aux eaux de drainage minier. De nombreuses études similaires montrent des résultats analogues sur la qualité des eaux de surface dans les sites miniers (Alvarenga *et al.*, 2021; Das & Semy, 2023; Ramli & Saputra, 2025). Ces observations pourraient être dues à l'oxydation des minéraux sulfurés. En effet, au cours de l'exploitation minière, ces minéraux sont mis en contact avec l'eau ou l'air, ce qui en génère des ions H^+ , responsables de cette acidité.

La conductivité électrique (CE) varie considérablement entre les différentes eaux examinées. (Tableau III.8). D'après les normes OMS (2017) et NF EN 27888 (1994), trois classes ont été détectées : (1) AB : eau modérément minéralisée ($200 \leq \text{CE} \leq 800 \mu\text{S/cm}$), il s'agit d'une source de qualité acceptable ; (2) la conductivité électrique de AM et AR varie respectivement entre 171 et 39,31 $\mu\text{S/cm}$ ($< 250 \mu\text{S/cm}$). Ces sources sont considérées comme étant des eaux très peu minéralisées (eaux très douces) ; (3) les eaux de surface ER1 et ER2 présentent une conductivité électrique variant entre 722,3 et 700,1 $\mu\text{S/cm}$ respectivement. Ces eaux sont classées comme peu à modérément minéralisées ($500 \leq \text{EC} \leq 2000 \mu\text{S/cm}$).

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Tableau III. 8. Qualités physico-chimiques des eaux de surface et eaux potables de la zone minière de Tamra : Aïn El Bell (AB) ; Aïn El Mota (AM) ; Aïn El Rechech (AR) ; eau de surface à proximité du point T3 (ER1) et eau de surface à proximité du point T6 (ER2).

	AB	AM	AR	ER1	ER2
pH	6,2 ± 0,01 c	6,57 ± 0,00 a	6,35 ± 0,00 b	5,48 ± 0,02 d	2,63 ± 0,06 e
CE (µS.cm ⁻¹)	542,02 ± 0,01 c	171 ± 0,03 d	39,31 ± 0,02 e	722,3 ± 0,02 a	700,1 ± 0,01 b
IQE	523,56	1,83	2,67	5,98	44,87

Potentiel de l'eau (pH (H₂O), conductivité électrique (CE), indice de qualité de l'eau (IQE). Les résultats sont présentés sous forme de valeur moyenne ± erreur standard (n = 3). Les lettres indiquent une différence significative selon le test LSD (p < 0,05).

Les concentrations des ETM dosés dans les eaux examinées sont présentées dans la Figure III.12. Leur abondance décroît globalement dans l'ordre suivant : Fe > Zn > Pb > Mn > As > Cd. Ces résultats montrent que les concentrations de fer dans les différents échantillons d'eau de la mine de Tamra respectent les valeurs guides de l'OMS (OMS, 2008), à l'exception d'Aïn El Bell (239,40 mg/L) et de l'eau de surface ER2 (10,66 mg/L) (Figure III.12a). Cela indique une forte contamination de ces eaux (AB et ER2) par le fer. Cette observation pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment la proximité de la source Aïn El Bell au site T7, identifié comme le plus riche en fer dans cette étude (§ 2.1), ainsi que le pH acide de l'échantillon ER2 (pH = 2.63 ; Tableau III.7). Cette acidité empêche la précipitation de fer et par conséquent augmente sa concentration dans l'eau. Pour le zinc, les concentrations sont également variées, avec les eaux de source contenant respectivement 4,33, 0,12 et 0,36 mg/L pour AB, AM et AR, alors que les eaux de surface présentent des concentrations en zinc de 0,28 et 10,66 mg/L pour ER1 et ER2, respectivement (Figure III.12b).

Chapitre III. Impacts écotoxécologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

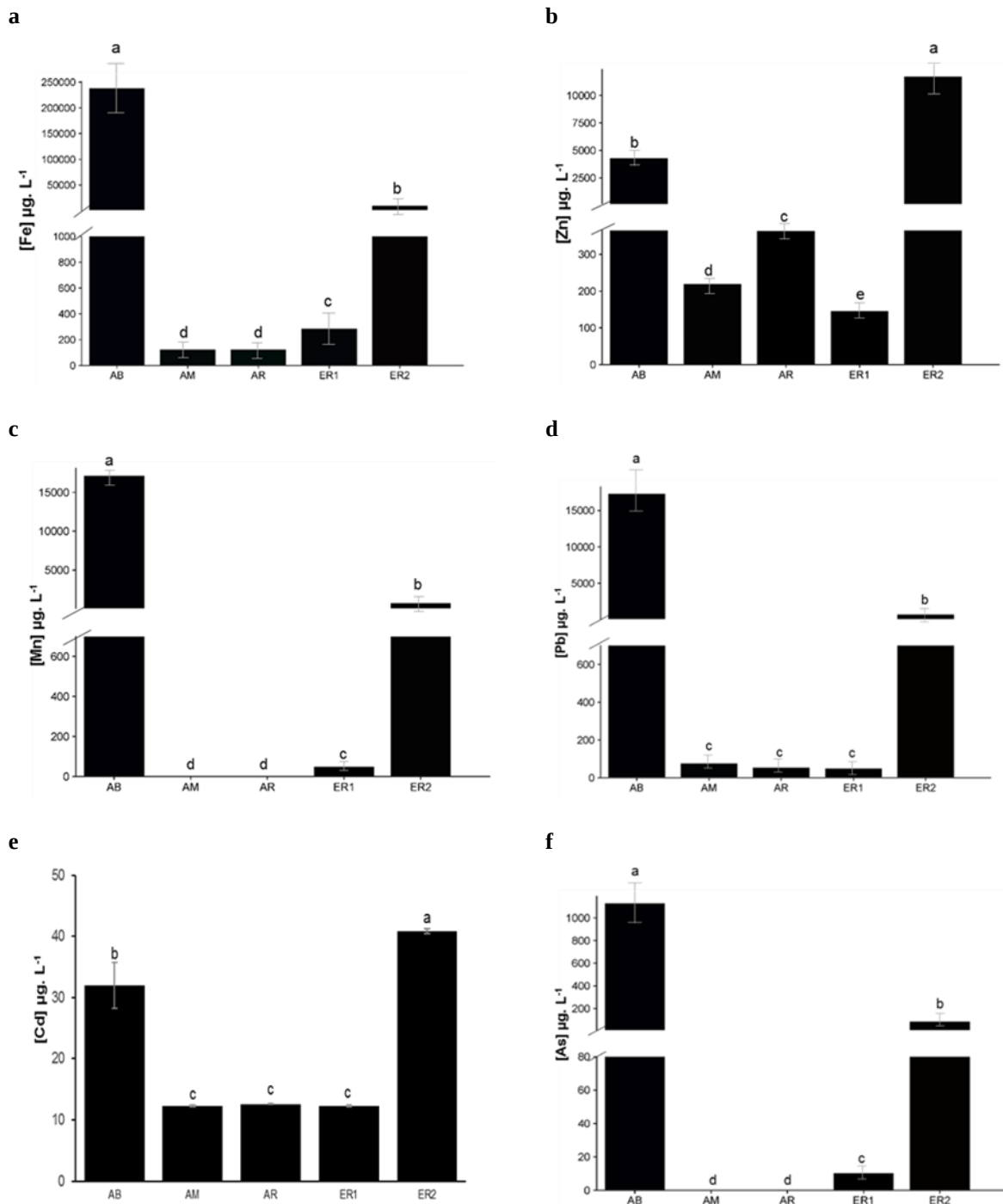


Figure III. 12. Concentrations des éléments traces des eaux de surface et des eaux potables de la zone minière de Tamra : Aïn El Bell (AB) ; Aïn El Mota (AM) ; Aïn El Rechech (AR) ; eau de surface à proximité du point T3 (ER1) et eau de surface à proximité du point T6 (ER2) : **a)** Fer (Fe), **b)** Zinc (Zn), **c)** Manganèse (Mn), **d)** Plomb (Pb), **e)** Cadmium (Cd) et **f)** Arsenic (As), ($n = 3 \pm$ écart type). Les lettres indiquent une différence significative selon le test LSD ($p < 0,05$).

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Ces résultats suggèrent également qu'Ain El Bell et ER2 dépassent considérablement les concentrations acceptables fixées par l'OMS pour le Zn dans l'eau potable (3 mg/L) et les eaux de surface (5 mg/L) (OMS, 2008).

De même, les concentrations de Mn varient entre 0 et 17,21 mg/L (Figure III.12c), AB présente la concentration la plus élevée dans l'eau de source (17,21 mg/L), ce qui dépasse largement la limite recommandée par l'OMS (2008) (0,4 mg/L) tandis que ER2 contient 0,79 mg/L de Mn, ce qui excède le seuil critique (0,05 mg/L) pour les eaux de surface, recommandé par EPA (1986). En revanche, toutes les concentrations de Pb excèdent largement les seuils critiques recommandés par l'OMS et EPA. Pour l'eau potable, elles varient respectivement de 17,36, 0,07 et 0,05 mg/L pour AB, AM et AR ($> 0,01$ mg/L). Par ailleurs, pour les eaux de surface, les concentrations de Pb varient entre 0,05 et 0,79 mg/L dans les échantillons ER1 et ER2, respectivement (Figure III.12d).

La variation des concentrations de Zn, Mn et Pb enregistrée dans les échantillons d'eau examinés pourrait être attribuée à leurs caractéristiques physicochimiques. En effet, la conductivité électrique élevée (542,02 $\mu\text{S}/\text{cm}$) et l'acidité significativement importante de l'échantillon AB par rapport à celles d'AM et AR pourraient révéler une forte concentration en ions dissous. En revanche, bien que la conductivité électrique d'ER1 soit significativement supérieure à celle de ER2 selon le test LSD ($p < 0,05$), la forte acidité de ER2 pourrait expliquer la variation enregistrée entre ces eaux de ruissellement. Cette acidité pourrait ainsi augmenter la mobilité et la toxicité de ces éléments dans l'eau (Bu *et al.*, 2024).

Par ailleurs, toutes les concentrations de Cd obtenues dans les cinq échantillons d'eau étudiés dépassent les valeurs guides (0,01 mg/L pour l'eau potable et 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ pour les eaux de surface) (EPA, 1986 ; OMS, 2008 ; 2017). L'ordre d'abondance est : ER2 $>$ AB $>$ AR $>$ ER1 $>$ AM (Figure III.12e). Cela pourrait s'expliquer par les valeurs de pH, car à des niveaux de pH plus bas, le cadmium peut se présenter sous forme d'ions Cd^{2+} libres (Shi *et al.*, 2024). Cependant, pour l'As, toutes les concentrations dépassent la limite de sécurité de l'OMS (0,01 mg/L), à l'exception de deux sources Aïn El Mota et Aïn El Rechech, dont la concentration est inférieure à la limite de détection de l'ICP (27,3 $\mu\text{g}/\text{L}$). Cette hétérogénéité dans les sources souterraines est probablement due à la géologie locale, à la minéralisation ou aux conditions redox dans les aquifères. Dans le cas des sites miniers présentant des eaux de drainage minier acides, la présence d'As est principalement sous forme d'arsénite (Shi *et al.*, 2024). Lors de son passage

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

du milieu réducteur vers un milieu plus oxydant, il s'oxyde en AsV. Ainsi, il se fixe rapidement sur les oxydes de fer, ce qui explique sa faible concentration dans les eaux de surface par rapport à la source « Aïn El Bell ». Ce processus permet de réduire sa mobilité et sa toxicité dans l'eau. Pour résumer, ces résultats suggèrent que la source Aïn El Bell est la plus contaminée par les différents éléments traces étudiés. Ceci pourrait être dû à ses caractéristiques physicochimiques, à sa localisation en aval de la mine ainsi qu'à sa proximité avec la zone T₇ qui présente des risques importants de pollution environnementale (§ 2.1). En outre, cette contamination pourrait également provenir à la fois du drainage minier acide et du transport des éléments traces étudiés. Une étude similaire menée sur le site minier de fer à ciel ouvert au sud de Sulawesi (Indonésie) a montré que les ruissellements peuvent modifier considérablement la composition chimique des sources voisines, augmentant ainsi la quantité totale de solides dissous (Ramli & Saputra, 2023). En revanche, la contamination des eaux de source « Aïn El Mota et Aïn El Rechech » par le Pb et le Cd pourrait être due au gradient thermique de la zone d'étude qui peut affecter la dynamique des eaux souterraines et la mobilité des polluants (Dong *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022). Ces résultats contredisent l'étude de Decrée *et al.*, (2010), qui concluaient que ces trois sources pouvaient être qualifiées d'eau potable selon les normes de l'OMS. Cette constatation pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment : 1) la dégradation progressive du site ; 2) la variation temporelle (Liu *et al.*, 2023) ; 3) la libération accrue des ETM étudiées ; 4) la méthode analytique utilisée ; et 5) les changements climatiques.

Afin d'évaluer la pollution globale de ces échantillons d'eau par les ETM étudiés, l'indice de qualité de l'eau (IQE) a été calculé (Tableau III.8). Les résultats montrent de faibles niveaux de pollution globale des sources Aïn El Mota et Aïn El Rechech, avec des valeurs respectives de 1,83 et 2,67, qui restent inférieures à la valeur critique (100) définie par Prasad & Bose (2001). Par contre, la source Aïn El Bell présente un très fort niveau de pollution qui dépasse largement le seuil critique (523,56). Cette source est donc inapte à la consommation humaine, et il est donc nécessaire d'en interdire la consommation. De plus, les eaux de surface ER1 (IQE = 5,98) sont légèrement contaminées, tandis que les eaux ER2 (IQE = 44,87) présentent une forte contamination (IQE > 30) selon l'échelle modifiée par Edet & Offiong, (2002). La contamination des eaux de surface de ce site représente également un défi environnemental majeur, tant pour la faune que pour la flore. De plus, l'absence de barrières physiques permet aux bétails des agriculteurs locaux de consommer directement ces eaux. Considérant les

Chapitre III. Impacts écotoxologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

résultats obtenus, il est donc nécessaire de mettre en œuvre des mesures de protection spécifiques, notamment : i) l'installation de barrières autour des zones de drainage afin de limiter l'exposition directe des eaux contaminées par les bétails ; ii) la mise en place de zones tampons végétalisées pour réduire l'érosion et la dispersion de ces contaminants ; iii) l'application par exemple de la chaux ou du calcaire broyé pour neutraliser l'acidité des eaux et, par conséquent, favoriser la précipitation des éléments traces et réduire leur mobilité et finalement iv) l'installation d'un système de filtration à base de biochar ou zéolithes pour capter ces polluants.

Afin de mieux interpréter les résultats obtenus, une analyse en composantes principales (ACP) a ensuite été menée sur les concentrations des éléments traces étudiés et d'indice de qualité de l'eau (IQE) pour les cinq échantillons (Figure III.13).

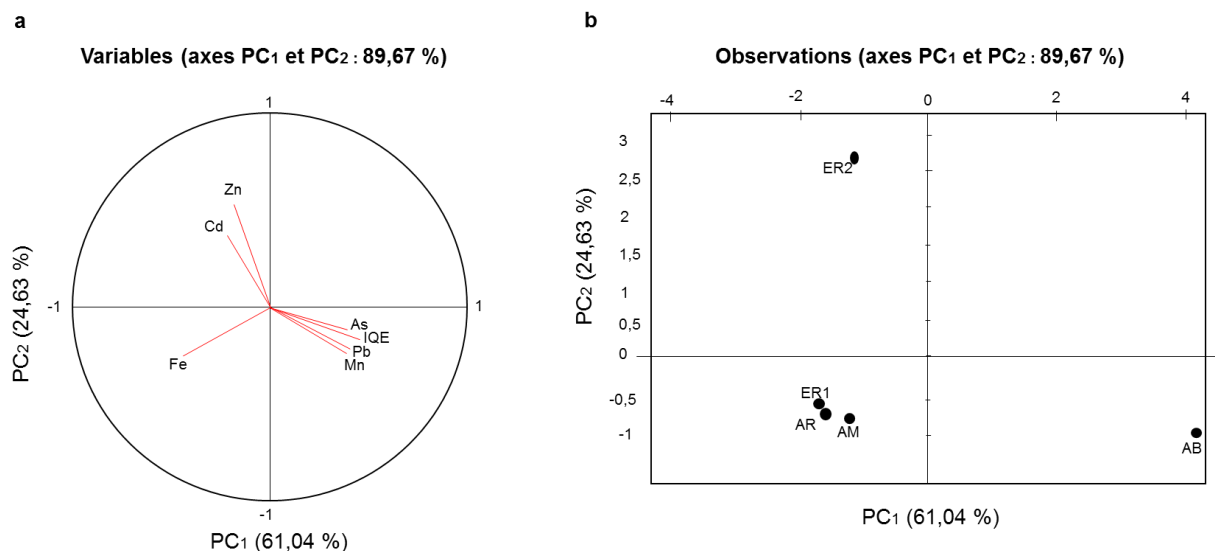


Figure III. 13. Analyse en composantes principales (ACP) : **a)** cercle des variables ; **b)** distribution des échantillons d'eau dans le plan factoriel PC1 $\times$ PC2 : Aïn El Bell (AB) ; Aïn El Mota (AM) ; Aïn El Rehech (AR) ; eau de surface à proximité du point T3 (ER1) ; eau de surface à proximité du point T6 (ER2) ; fer (Fe) ; zinc (Zn) ; manganèse (Mn) ; plomb (Pb) ; cadmium (Cd) ; arsenic (As), et indice de qualité de l'eau (IQE).

Cette méthode permet d'avoir une lecture synthétique des relations entre ces éléments traces et IQE dans les eaux. Les deux axes principaux représentent 89,67 % de la variance totale. Le premier axe (PC₁), qui représente 61,04 % de la variabilité, regroupe les concentrations d'As, Mn, Pb et IQE suggérant un effet synergique. Ces éléments apparaissent donc comme des indicateurs majeurs de la pollution de l'eau dans la zone minière de Tamra. Bien que la

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

concentration totale de Fe dans le sol minier de Tamra soit plus élevée par rapport aux autres éléments étudiés (§2.1), le Mn^{2+} peut être facilement libéré dans le système aquatique de la zone. Ceci pourrait s'expliquer par les cycles redox du Mn et du Fe. En effet, dans certaines conditions comme l'oxydation, le Mn^{2+} s'oxyde très lentement, ce qui lui permet de rester sous forme soluble plus longtemps. En revanche, le Fe^{2+} se transforme rapidement en Fe^{3+} , formant ainsi des oxydes et des hydroxydes insolubles (Huang *et al.*, 2021; Bao *et al.*, 2022).

En outre, les concentrations de Pb et d'As sont modérées à faibles dans le sol par rapport aux autres éléments étudiés tels que le Fe et le Zn, mais elles ont un impact majeur sur la pollution de l'eau peut être en raison de leur toxicité élevée et de leur biodisponibilité relative dans le sol (§ 2.1) (Prakash & Verma, 2021; Mousavi *et al.*, 2022; Mukherjee *et al.*, 2024).

Le second axe (PC_2), qui représente 24,63 % de la variance totale, est dominé par le cadmium et le zinc. Ceci indique que ces éléments constituent des sources secondaires de la pollution de l'eau de la zone d'étude, partiellement indépendantes d'As, Pb et Mn. La répartition des échantillons d'eau dans le plan factoriel ($PC_1 \times PC_2$) montre la présence de trois groupes : (1) le premier représente l'eau de surface (ER2), qui se distingue par les concentrations les plus élevées de Cd et Zn, (2) le deuxième groupe rassemble l'eau de surface (ER1), Aïn El Mota (AM) et Aïn El Rechech (AR) qui se distinguent par leur faible pollution, enfin, (3) le troisième représente la source Aïn El Bell, qui se caractérise par le niveau le plus élevé de IQE.

Ces résultats soulignent que l'impact des principaux éléments polluants sur le milieu aquatique de la zone d'étude ne dépend pas uniquement de leur concentration et de leur toxicité intrinsèque. Cependant, cette étude présente certaines limites qu'il convient de mentionner. En effet, la variabilité temporelle des conditions hydrogéochimiques peut entraîner une sous-évaluation ou une sur-évaluation de la pollution lorsque les mesures sont basées sur une campagne ponctuelle (Setia *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023). Par ailleurs, elle s'appuie uniquement sur des indices de qualité de l'eau, sans étudier la spéciation chimique et la biodisponibilité de ces éléments qui déterminent leur toxicité réelle (Hao *et al.*, 2021; Murillo-Delgado *et al.*, 2021). En définitive, certains processus géochimiques et biologiques, tels que la précipitation, la dissolution et les cycles redox des phases minérales secondaires et l'activité microbienne, contribuent significativement à la dégradation de la qualité de l'eau (Linnik *et al.*, 2023). Cependant, ces processus n'ont pas encore été étudiés et nécessitent des investigations supplémentaires.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

En complément des analyses réalisées sur les eaux étudiées, un test de phytotoxicité a été effectué à l'aide des graines de *L. sativum* (cresson). Ce test a permis d'évaluer l'impact réel des éléments étudiés sur la première phase de germination de cette espèce. Après la période d'incubation de 72 heures, les graines ont germé dans tous les échantillons testés avec des différences significatives par rapport à celles du contrôle, à l'exception de la source Aïn El Mota (Figure III.14). Ceci pourrait être dû à son faible indice de pollution et son pH neutre à légèrement alcalin (Tableau III.8). Alors que, les graines germées en présence de l'eau d'Aïn El Bell présentent la proportion la plus faible. Cette inhibition pourrait être attribuée à l'effet combiné des caractéristiques physicochimiques et de la forte contamination de ces eaux.

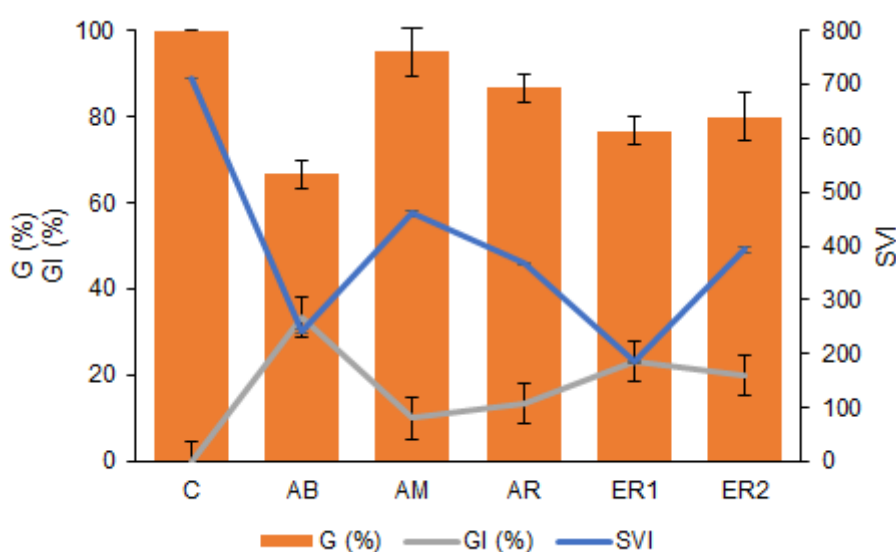


Figure III. 14. Résultats du test de germination des graines de *L. sativum* en présence des eaux de surface et des eaux potables de la zone minière de Tamra ($n = 30 \pm$ écart type): Eau distillée stérile (C) ; Aïn El Bell (AB) ; Aïn El Mota (AM) ; Aïn El Rechech (AR) ; eau de surface à proximité du point T3 (ER1) et eau de surface à proximité du point T6 (ER2) : G (%) : pourcentage de germination des graines, GI (%) : indice de germination, et SVI : indice de vigueur.

Par ailleurs, l'indice de germination varie entre 10 et 33,3 % tandis que l'indice de vigueur (SVI) s'étend va de 184,43 à 710,66. L'ensemble des lots testés a présenté des valeurs significativement inférieures à celles des graines témoins, traduisant une altération notable du pouvoir germinatif. La faible valeur de SVI observée dans le lot de ER1 pourrait s'expliquer par sa forte salinité ($CE = 722,3 \mu S/cm$). En effet, la salinité élevée de l'eau pourrait exercer un double effet, osmotique et ionique, réduisant ainsi la capacité d'imbibition, perturbant le métabolisme embryonnaire et diminuant le SVI (Javed *et al.*, 2022). Ces résultats suggèrent que les graines de cresson exposées aux eaux de Tamra subissent un stress abiotique, se traduisant

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

par une diminution de la vigueur physiologique et une compromission de la germination. Cet effet inhibiteur peut être attribué à l'effet combiné de l'acidité, de la salinité et de la présence des ETM en excès, susceptibles d'induire une toxicité ionique et un stress oxydatif. Globalement, ces polluants exercent un effet néfaste sur les processus germinatifs et la croissance des plantules. Des résultats similaires ont été rapportés par Vladimirova *et al.* (2024). Par ailleurs, l'objectif de cette étude était d'évaluer les effets potentiels de l'activité minière de Tamra sur les caractéristiques physico-chimiques et la qualité de l'eau de cette zone (eaux de surface et eaux de source). Les résultats obtenus soulignent le besoin immédiat de gestion de l'environnement aquatique dans la région de Tamra, avec une attention particulière pour la source Aïn El Bell, qui pourrait avoir un impact plus grave sur la santé humaine, en particulier chez les enfants de l'école primaire de Tamra qui utilisent quotidiennement cette source comme eau potable. De plus, la présence de Cd, As et Pb dans les trois sources étudiées pourrait présenter de graves risques pour la santé de la population locale. Il convient donc d'accorder une vigilance particulière à ces éléments toxiques. Ainsi, la gestion nécessite une stratégie préventive. Les eaux de sources doivent être en priorité protégées afin de limiter le risque sanitaire. Cela implique la mise en place de systèmes d'étanchéité ou de zones tampons, accompagnés d'une surveillance régulière. Par ailleurs, les eaux de surface sont exposées à des eaux de ruissellement chargées en éléments traces présents dans le site et de matière en suspension, nécessitant la mise en place de bassins de décantation, de filtres biologiques ou de zones végétalisées capables de limiter la pollution avant son rejet dans l'environnement.

Dans le cadre de recherches futures, l'utilisation de lombriques (vers de terre) comme bioindicateur pourrait constituer un outil complémentaire pour élargir l'évaluation de la toxicité potentielle des eaux testées du site minier de Tamra. Une telle approche permettrait d'ouvrir une évaluation plus écosystémique de la qualité environnementale du système aquatique. Parallèlement à cette étude toxicologique du milieu aquatique du site minier de Tamra, il s'avère nécessaire d'évaluer les risques sanitaires liés à la présence des éléments traces dans le sol.

3.2. Bioaccessibilité des ETM

Le test SBET a été réalisé sur les neuf sols prélevés sur le site minier de Tamra (§2.1) afin d'évaluer la biodisponibilité orale de Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As (Mendoza *et al.*, 2017). Cette

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

méthode permet de stimuler la phase gastrique humaine. Ainsi, l'ordre d'abondance de ces éléments est : $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Pb} > \text{Zn} > \text{As} > \text{Cd}$ (Figure III.15). Les concentrations de Fe varient significativement de 892,80 à 3460 mg.kg^{-1} (Figure III.15a). La valeur la plus importante a été enregistrée sur le site T3, alors que la plus basse a été observée à T4. Ces deux sites présentent une grande proximité géographique dans la mine, mais une différence importante a été notée. Cette variation peut s'expliquer par l'hétérogénéité minéralogique et physico-chimique du site. En effet, d'après les résultats obtenus (§ 2.1), le site T3 comporte 76,2 % de quartz, 20 % d'hématite et 3,6 % de calcite, tandis que le site T4 présente 12 % de quartz, 38,1 % d'hématite et 49,2 % de goethite. Bien que le site T4 présente une concentration totale plus élevée, le site T3 est caractérisé par la présence de Fe mal cristallisé dont la solubilité est plus élevée, un pH légèrement acide, une forte teneur en matière organique et la présence de faible proportion de calcite. Ces conditions peuvent favoriser la libération rapide du fer dans l'environnement gastrique (pH acide) (Loeppert & Clarke, 1984; Ćirić *et al.*, 2023).

Chapitre III. Impacts écotoxologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

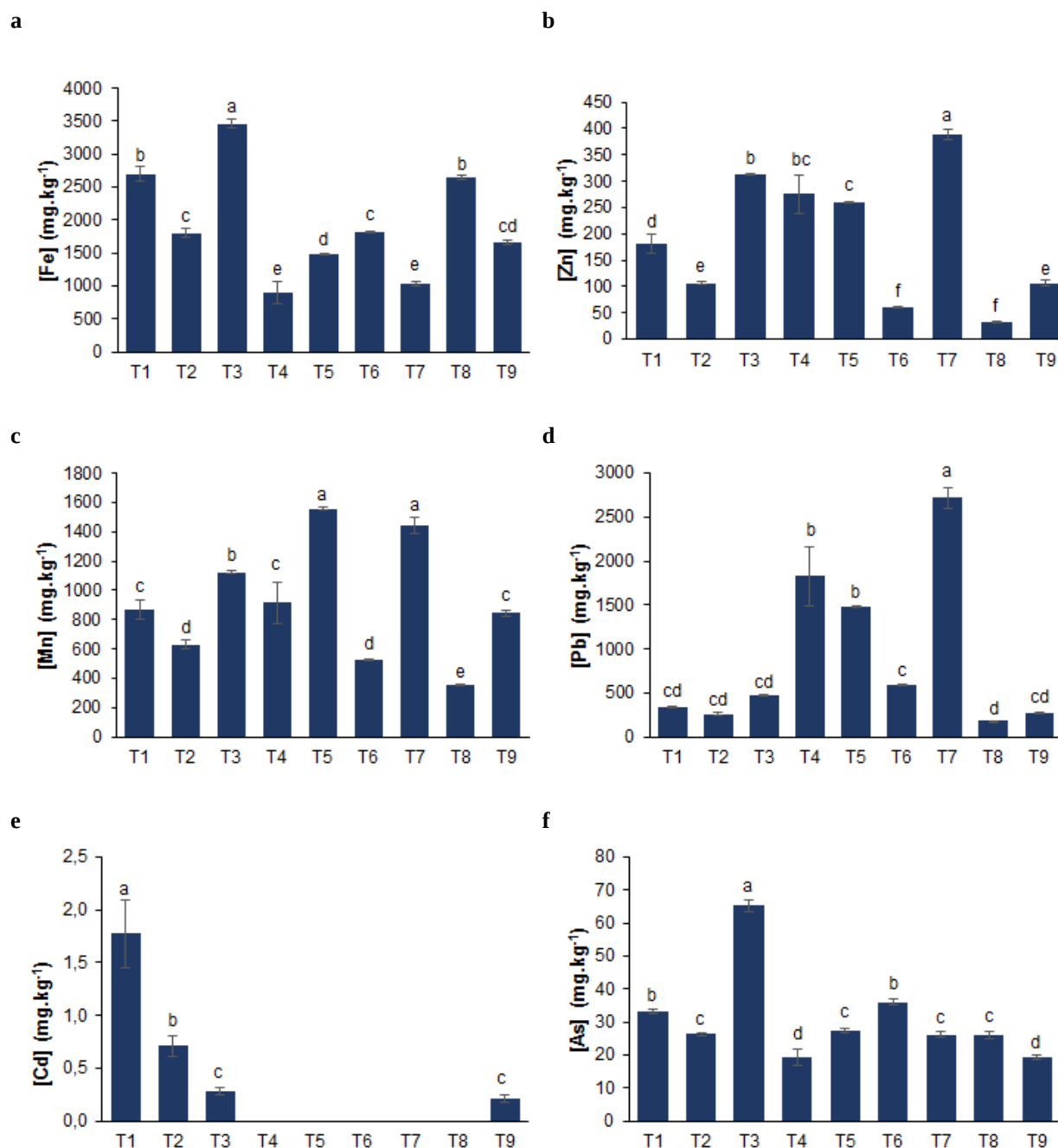


Figure III. 15. Fractions bioaccessibles des éléments traces (mg/kg de poids sec) des différents échantillons de sol T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra, T4, T5 et T6 : au milieu de la mine de Tamra et T7, T8, T9 : en aval de la mine de Tamra : **a)** Fer (Fe), **b)** Zinc (Zn), **c)** Manganèse (Mn), **d)** Plomb (Pb), **e)** Cadmium (Cd) et **f)** Arsenic (As). Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne $\pm$ erreur standard (n = 3). Les lettres indiquent une différence significative à $p < 0,05$ selon le test LSD.

Par ailleurs, la fraction bioaccessible de zinc varie de 32,23 à 389,07 mg.kg⁻¹ (Figure III.15b). Cette variation pourrait être également attribuée à l'hétérogénéité de la composition

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

minéralogique et des caractéristiques physicochimiques du site. La valeur la plus importante a été enregistrée sur le site T3. Ce site est caractérisé par la forte teneur en argile (76,53 %) (§2.1). Dans les conditions gastriques, ces argiles peuvent libérer des quantités plus importantes de Zn, favorisant ainsi une plus grande fraction bioaccessible (Schlatzl *et al.*, 2021).

Les concentrations bioaccessibles de Mn sont importantes (variant de 350,58 à 1556,07 mg.kg⁻¹) (Figure III.15c). Cette variation pourrait être liée à plusieurs facteurs notamment, *i*) le processus redox qui contrôle de manière critique la bioaccessibilité de Mn dans les zones minières (Swanson *et al.*, 2023), *ii*) la composition de communautés microbiennes qui joue un rôle important dans la fraction bioaccessible. Stroud *et al.*, (2014) ont montré que la tolérance microbienne a une influence sur la bioaccessibilité du Mn. *iii*) les conditions anoxiques capables de stabiliser le Mn sous des formes moins bioaccessibles (Swanson *et al.*, 2023).

Pour Pb, la fraction bioaccessible varie de 180,14 à 2716,44 mg.kg⁻¹, avec le site T7 présentant la plus forte teneur (Figure III.15d). Ce site est caractérisé par la concentration totale la plus élevée du Pb (§ 2.1). Cependant, Good *et al.*, (2024) ont montré que sa concentration totale seule ne détermine pas sa bioaccessibilité. Par contre, plusieurs études ont souligné l'influence des propriétés physicochimiques et minéralogiques du sol sur la bioaccessibilité du Pb. Walraven *et al.*, (2015) ont montré que le pH, la teneur en matière organique (MO) et la concentration de fer réactif influencent considérablement la biodisponibilité du plomb. De même, Good *et al.*, (2024) ont montré également que la forte teneur en MO et la neutralité du pH réduisent la bioaccessibilité du Pb. En outre, les oxydes de Fe et d'Al ont été considérés également comme des principaux facteurs dans sa bioaccessibilité (Lake *et al.*, 2021). En revanche, Mao *et al.*, (2025) ont signalé l'effet plus important de la teneur en oxydes de manganèse (MnO₂) en raison de son comportement géochimique. Ces oxydes ont une affinité très élevée pour le Pb²⁺, ce qui modifie sa spéciation.

La fraction bioaccessible de Cd était également variable, représentant des faibles concentrations allant de 0 à 1,77 mg.kg⁻¹ (Figure III.15e) selon les sites. Ces observations pourraient être attribuées à sa faible concentration globale dans le sol ainsi qu'à l'hétérogénéité des propriétés physicochimiques du site, en particulier la proportion des particules fines et la valeur du pH (Mao *et al.*, 2025). Finalement, l'As a montré une variabilité significative, allant de 19,13 mg.kg⁻¹ (T4) à 65,28 mg.kg⁻¹ (T3) (Figure III.15f). Ceci pourrait être dû à la variation de la composition minéralogique du sol. En effet, Kim *et al.*, (2014) ont montré que les oxydes de

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

fer ainsi que les produits d'altération des minéraux sulfurés tels que la pyrite (FeS_2), la Sphalérite (ZnS) et la galène (PbS) contrôlent la fixation de l'As. Ainsi, ce dernier, lié aux oxydes de fer amorphes, est plus facilement bioaccessible. De même, Lake *et al.*, (2021) ont considéré les oxydes de Fe comme un facteur important qui influence la bioaccessibilité d'As. Pour résumer, cette étude démontre qu'il y a des variations significatives de la fraction bioaccessible des éléments traces étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) selon les zones du site minier de Tamra. Ces différences reflètent l'influence conjointe de la minéralogie et des conditions locales sur la bioaccessibilité gastrique des éléments étudiés. Ces observations ouvrent de nouvelles pistes pour de futures recherches afin de mieux comprendre les risques associés à ces polluants dans le site minier de Tamra. Une étude géochimique complémentaire (non extractive) pourrait être envisagée à l'aide de techniques de spectroscopie d'absorption des rayons X. Ces techniques permettent d'évaluer la spéciation des ETM étudiés dans le sol. Deux approches pourraient être prises en considération : *i*) la première est la spectroscopie XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) pour déterminer l'état d'oxydation des éléments étudiés et *ii*) la seconde est la spectroscopie EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) afin de définir leurs structures atomiques et d'identifier clairement leurs formes porteuses solides. Il serait également pertinent de réaliser un suivi temporel afin de considérer la dynamique de la biodisponibilité des ETM dans la phase gastrique en fonction des conditions climatiques.

Étant la première étude réalisée sur ce site, les résultats obtenus fournissent une base de référence utile pour l'évaluation de la bioaccessibilité des ETM et pour la mise en place de stratégies de gestion des risques, notamment : *i*) la mise en œuvre de procédés de phytostabilisation ciblés afin de réduire l'impact des éléments dominants dans les zones les plus affectées ; *ii*) la limitation de l'exposition humaine à ces polluants par des mesures réglementaires ; *iii*) la sensibilisation et l'information des communautés locales aux dangers et finalement ; *iv*) la mise en place d'un suivi environnemental et sanitaire permanent pour évaluer l'efficacité des mesures prises.

Au-delà des tests réalisés dans la présente étude, une évaluation des risques sanitaires est nécessaire afin d'apprécier les conséquences potentielles de l'exposition des éléments traces présents dans les sols miniers de Tamra sur la santé humaine.

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

3.3. Estimation des risques sanitaires pour les populations locales

Cette partie examine les risques cancérogènes et non cancérogènes pour la santé de la population locale, liés à la contamination par les ETM étudiés présents dans les sols miniers de Tamra, en tenant compte des diverses voies d'exposition pour les enfants et les adultes.

3.3.1. Évaluation des risques non cancérogènes

L'évaluation des risques sanitaires non cancérogènes a porté sur les six éléments traces étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans les sols de surface de la mine de Tamra et pour les trois voies d'exposition : ingestion, inhalation (respiration) et contact cutané à la fois pour les enfants et les adultes. Cette évaluation est basée sur les valeurs de quotient de risque (QR) et l'indice de dangerosité (ID), calculés pour chaque élément et chaque groupe d'âge. Les résultats montrent que l'ID pour tous les éléments traces étudiés dépasse les seuils de sécurité ($ID > 1$), ce qui indique que ces éléments représentent un risque non cancérogène élevé pour la population locale (USEPA, 1989, 2002; DEA, 2010; Luo *et al.*, 2012, Oyebamiji *et al.*, 2024). Le plomb et l'arsenic sont considérés comme des contaminants prioritaires à la fois pour les adultes et les enfants, malgré l'abondance de Fe et de Mn dans le site d'étude. Le Pb varie entre $8,48E+4$ et $1,02E+8$ pour les enfants (Tableau III.9) et entre $7,11E+6$ à $2,75E+8$ pour les adultes (Tableau III.10). Ceci pourrait s'expliquer par l'association de la minéralisation ferreuse avec des concentrations élevées de Pb-Zn, formant une couche de fer sur les sulfures d'hydrogène (Decrée *et al.*, 2008; Negra, 1987). Alors que l'ID de l'As varie de 106,82 à $7,13E+6$ pour les enfants (Tableau III.9) et de $1,29E+7$ à $6,98E+7$ pour les adultes (Tableau III.10).

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Tableau III. 9. Risques non cancérogènes pour les enfants de la zone d'étude : QR-ing : quotient de risque par ingestion ; QR-res : quotient de risque par voie respiratoire ; QR-cut : quotient de risque par contact cutané ; ID : indice de dangerosité.

Risques non- Cancérogènes		Amont de la mine			Milieu de la mine			Aval de la mine			Moyenne
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
Fe	QR-ing	4,98E+5	3,27E+5	1,09E+6	1,70E+6	9,70E+6	9,19E+5	2,12E+6	1,54E+6	5,11E+5	1,07E+7
	QR-res	1,99	0,01	4,38	6,79	3,87	3,67	8,49	6,17	2,04	
	QR-cut	0,24	0,16	0,53	0,83	0,47	0,45	1,04	0,75	0,25	
	ID	4,98E+5	3,27E+5	1,09E+6	1,70E+6	9,70E+6	9,19E+5	2,12E+6	1,54E+6	5,11E+5	
Zn	QR-ing	1,64E+4	4,96E-06	2,26E-05	1,25E+5	5,75E+4	3,00E+4	3,34E+5	1,05E+5	3,07E+4	7,78E+4
	QR-res	0,06	0,04	0,18	0,47	0,21	0,11	1,27	0,40	0,11	
	QR-cut	0,03	0,02	0,10	0,27	0,11	0,06	0,68	0,21	0,06	
	ID	1,64E+4	0,06	0,28	1,25E+5	5,75E+4	3,00E+4	3,34E+5	1,05E+5	3,07E+4	
Mn	QR-ing	5,76E+5	2,30E+5	9,93E+5	3,92E+6	1,54E+6	8,37E+5	5,91E+6	6,90E+5	5,54E+5	1,71E+6
	QR-res	7,05E+3	2,81E+3	1,21 E+4	4,80E+3	1,89E+3	1,02E+3	7,24E+3	7,71E+3	6,78E+3	
	QR-cut	5,85	2,33	10,08	39,86	15,71	8,50	60,09	6,39	5,62	
	ID	5,83E+5	2,32E+5	1,00E+6	3,97E+6	1,56E+6	8,48E+5	5,99E+6	6,98E+5	5,61E+5	
Pb	QR-ing	4,24E+6	2,65E+6	8,48E+4	4,68E+7	2,02E+7	9,92E+6	1,02E+8	1,57E+7	6,75E+6	2,42E+7
	QR-res	6,95	4,35	13,91	76,79	33,18	16,27	168,76	25,84	11,06	
	QR-cut	4,62	2,89	9,26	51,11	22,08	10,83	112,32	17,19	7,36	
	ID	4,24E+6	2,65E+6	8,48E+4	4,68E+7	2,02E+7	9,92E+6	1,02E+8	1,57E+7	6,75E+6	
Cd	QR-ing	5,78E+4	4,64E+4	6,10E+4	3,13E-05	5,00E+4	4,76E+4	5,75E+4	1,63E+4	1,71E+4	
	QR-res	0,22	0,17	0,23	0,26	107,84	52,88	548,49	83,98	35,96	

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

	QR-cut	0,94	0,75	0,99	1,12	0,81	0,77	0,94	0,26	0,27	
	ID	5,78E+4	4,64E+4	6,10E+4	1,38	5,01E+4	4,77E+4	5,81E+4	1,63E+4	1,71E+4	3,94E+4
	QR-ing	7,13E+6	4,81E+6	2,60E+7	4,74E-03	1,06E+7	1,55E+7	2,27E+7	1,13E+7	8,01E+6	
As	QR-res	66,26	44,70	242,16	96,47	98,58	144,47	205,82	105,60	74,40	
	QR-cut	7,11	4,79	25,98	10,35	10,57	15,50	22,08	11,33	7,98	
	ID	7,13E+6	4,81E+6	2,60E+7	106,82	1,06E+7	1,55E+7	2,27E+7	1,13E+7	8,01E+6	1,17E+7

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Le Tableau III.8 présente les résultats des calculs des quotients de risque par les différentes voies d'exposition, ainsi que les indices de danger (ID) pour les enfants. Les résultats montrent que l'ID a été trouvé dans l'ordre de $Pb > As > Fe > Mn > Zn > Cd$.

Ce métalloïde peut être présent dans le sol sous des formes partiellement solubles telles que l'arsénite (As^{III}) et l'arséniate (As^V) (Várallyay *et al.*, 2024), ce qui favorise sa pénétration par les voies d'exposition, en particulier l'ingestion. Diami *et al.*, (2016) ont également constaté que dans les zones d'extraction de minerai de fer en Malaisie, l'arsenic est le métalloïde le plus dangereux par rapport aux autres éléments traces tels que Fe, Mn, Zn, Pb.

Nos résultats ont également mis en évidence que l'exposition par ingestion est la principale voie de risque sanitaire exposée pour les deux groupes d'âges (enfants et adultes) (Tableaux III.3 ; III.10). En effet, les éléments traces étudiés dans le sol peuvent être plus facilement dissous dans les conditions acides du système digestif, ce qui favorise leur absorption par l'organisme humain (Altundag *et al.*, 2015). En revanche, l'absorption par les voies respiratoires et cutanées reste faible, ce qui explique le QR plus élevé par voie orale. La mine de fer d'Aït Ammar au Maroc a fait l'objet d'une étude similaire qui a également démontré que l'ingestion de particules de sol représentait un risque plus important pour la santé par rapport à l'absorption cutanée et l'inhalation (Nouri *et al.*, 2017).

De plus, les valeurs moyennes des indices de danger pour tous les éléments étudiés pour le site de Tamra ont montré que les adultes étaient plus exposés que les enfants, sauf le Fe et le Cd. De même, Bello *et al.*, (2019) ont constaté que les indices de risque globaux étaient plus marqués chez les adultes (0,810) que chez les enfants (0,125) dans les mines d'or artisanales nigérianes, pour le chrome, l'arsenic et le cobalt, mais tout en restant inférieurs aux seuils de sécurité ($ID = 1$). Par contre, Kamunda *et al.*, (2016) ont démontré que les enfants des zones d'exploitation aurifère en Afrique du Sud présentaient des indices de risque plus élevés (43,80) que les adultes (2,13). Diami *et al.*, (2016) ont également révélé que les enfants de la mine de fer en Malaisie étaient exposés à des risques plus élevés. Au Maroc, la mine de fer d'Ait Ammar a fait l'objet également d'une étude de risque portant sur le Cd, le Cr, le Cu, le Fe, le Pb et le Zn, qui a montré que les valeurs de l'indice de dangerosité (ID) chez les enfants ne dépassaient le niveau de sécurité que pour le Cr (13,1) (Nouri *et al.*, 2017).

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Tableau III. 10. Risques non cancérogènes pour les adultes de la zone d'étude : QR-ing : quotient de risque par ingestion ; QR-res : quotient de risque par voie respiratoire ; QR-cut : quotient de risque par contact cutané ; ID : indice de dangerosité.

Risques non - cancérogènes		Amont de la mine			Milieu de la mine			Aval de la mine			Moyenne
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
Fe	QR-ing	1,33E+6	8,77E+5	2,93E+6	4,55E+6	2,59E+6	2,46E+6	5,69E+6	4,14E+6	1,36E+6	2,88E+6
	QR-res	0,85	0,56	1,87	2,91	1,66	1,57	3,64	2,64	0,87	
	QR-cut	0,05	0,03	0,11	0,17	0,09	0,09	0,21	0,15	0,05	
	ID	1,33E+6	8,77E+5	2,93E+6	4,55E+6	2,59E+6	2,46E+6	5,69E+6	4,14E+6	1,36E+6	
Zn	QR-ing	4,40E+4	2,91E+4	1,32E+5	3,37E+5	1,54E+5	8,03E+4	8,96E+5	8,03E+4	8,24E+4	2,04E+5
	QR-res	6,69E-05	0,01	0,08	0,20	0,09	0,07	0,54	0,17	0,05	
	QR-cut	6,94E-03	4,60E-03	0,02	0,05	0,02	0,01	0,14	0,04	0,01	
	ID	4,40E+4	2,91E+4	1,32E+5	3,37E+5	1,54E+5	8,03E+4	8,96E+5	8,03E+4	8,24E+4	
Mn	QR-ing	1,54E+6	6,17E+5	2,66E+6	1,05E+7	4,15E+6	2,24E+6	1,58E+6	1,69E+6	1,48E+6	4,53E+6
	QR-res	3,02E+3	1,20E+3	5,20E+3	2,05E+4	8,12E+3	4,39E+3	3,10E+3	3,30E+3	2,90E+3	
	QR-cut	1,21	0,48	2,08	8,25	3,25	1,76	12,44	1,32	1,16	
	ID	1,54E+6	6,17E+5	2,66E+6	1,05E+7	4,15E+6	2,24E+6	1,58E+6	1,69E+6	1,48E+6	
Pb	QR-ing	1,13E+7	7,11E+6	2,27E+7	1,25E+8	5,42E+7	2,65E+7	2,75E+8	4,22E+7	1,80E+7	6,48E+7
	QR-res	2,98	1,86	5,96	32,91	14,22	6,97	72,32	11,07	4,74	
	QR-cut	0,95	0,60	1,91	10,58	4,57	2,24	23,26	3,56	1,52	
	ID	1,13E+7	7,11E+6	2,27E+7	1,25E+8	5,42E+7	2,65E+7	2,75E+8	4,22E+7	1,80E+7	
Cd	QR-ing	1,54E+5	1,24E+5	1,63E+5	1,83E+5	1,34E+5	1,27E+5	1,54E+5	4,36E+4	4,58E+4	
	QR-res	0,09	0,07	0,09	0,11	0,08	0,07	0,09	0,02	0,02	

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

	QR-cut	0,19	0,15	0,20	0,23	0,16	0,16	0,19	0,05	0,05	
	ID	1,54E+5	1,24E+5	1,63E+5	1,83E+5	1,34E+5	1,27E+5	1,54E+5	4,36E+4	4,58E+4	1,25E+5
	QR-ing	1,91E+7	1,29E+7	6,98E+7	2,78E+7	2,84E+5	4,16E+7	5,94E+7	3,04E+7	2,14E+7	
As	QR-res	28,39	19,15	103,78	42,24	42,24	61,91	88,20	45,25	31,88	
	QR-cut	1,47	1,03	5,38	2,14	2,20	3,21	4,57	2,34	1,65	
	ID	1,91E+7	1,29E+7	6,98E+7	2,78E+7	2,84E+5	4,16E+7	5,94E+7	3,04E+7	2,14E+7	3,45E+7

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

En Tunisie, Ghorbel *et al.*, (2010) ont montré également des risques sanitaires liés à l'ancien site minier de Jebel Ressas, qui sont particulièrement importants pour les enfants plutôt que pour les adultes. Ces résultats suggèrent une vulnérabilité variable en fonction du type de métal et du groupe d'âge.

De plus, les valeurs d'ID des trois zones étudiées dans la mine ont suivi une tendance décroissante : milieu > aval > amont, probablement liée à l'activité minière, à l'exception de Cd qui est plus élevé en amont. Les quotients de risque (QR) de Fe pour les deux voies d'exposition (ingestion et inhalation) sont largement supérieurs à 1, à l'exception du QR par l'inhalation pour T2 (QR = 0,01). Cependant, les QR pour l'exposition cutanée sont tous inférieurs à 1, ce qui suggère que cette voie d'exposition ne présente pas de risque évident pour les enfants (USEPA, 1989, 2002 ; DEA, 2010), à l'exception de T7 (RQ = 1,04). De même pour le zinc, les valeurs du QR par ingestion sont supérieures à 1, alors que celles par voie d'inhalation et de cutanée sont inférieures à 1, à l'exception de T7 pour l'inhalation. Cela pourrait être dû à l'hétérogénéité de la distribution de Fe et de Zn, ces 2 métaux étant plus concentrés à cet endroit. En outre, les valeurs du QR pour le manganèse dans les trois voies d'exposition sont nettement supérieures au niveau de sécurité (QR > 1). Ce résultat s'explique par la forte capacité du Mn à traverser diverses barrières biologiques (Aljelehawy, 2022 ; Kim *et al.*, 2022). Par ailleurs, la voie respiratoire (inhalation) apparaît comme la deuxième voie d'exposition pour ce métal, ce qui peut expliquer son impact neurologique avéré par inhalation (Aljelehawy, 2022 ; Kim *et al.*, 2022). De même, pour le plomb, les valeurs QR sont largement supérieures à 1, ce qui signifie qu'il constitue clairement un risque pour les enfants de la zone de Tamra. Ceci s'explique par son affinité biologique élevée et sa capacité de pénétrer les tissus humains en se liant aux protéines et aux lipides (Balali-Mood *et al.*, 2021 ; Witkowska *et al.*, 2021).

Les valeurs du QR de Cd varient considérablement. Elles sont largement supérieures à 1 pour la voie orale, ce qui suggère que cette voie d'exposition présente des risques avérés pour les enfants (USEPA, 1989, 2002), à l'exception du point T4. Cependant, on a noté une variation marquée pour la voie respiratoire, avec des valeurs du QR inférieures à la limite de sécurité pour T1, T2, T3 et T4 alors qu'elles étaient supérieures à 1 pour les points T5, T6, T7, T8 et T9. Cette observation pourrait être liée aux résultats obtenus dans le cadre de la spéciation de ce métal présentés dans l'article (§ 2.1). En effet, les sols en amont possèdent une fraction échangeable plus élevée, tandis que ceux au milieu et en aval de la mine présentent une forte

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

association avec la fraction oxydable et la fraction résiduelle. Bien que ces deux fractions (oxydable et résiduelle) soient moins mobiles sur le plan géochimique, elles sont concentrées dans des particules fines qui peuvent être inhalées et parcourir de longues distances, augmentant ainsi le niveau d'exposition par voie respiratoire (Sah *et al.*, 2019). En outre, les valeurs du QR pour la voie cutanée sont toutes inférieures à 1, à l'exception de T4 (QR = 1,12). Cela pourrait être dû à l'hétérogénéité de la distribution de Cd, qui est plus concentrée à cet endroit (§ 2.1). Finalement, les valeurs du QR de l'arsenic dans les trois voies d'exposition sont nettement supérieures au niveau de sécurité (QR > 1). Ce résultat s'explique par sa forte toxicité, la présence de la fraction plus mobile en faible proportion ainsi que par une activité minière quotidienne qui entraîne une exposition importante aux particules fines du sol contaminé (Patel *et al.*, 2023). En revanche, les valeurs d'ID les plus élevées ont été enregistrées au point T7 pour tous les éléments traces étudiés, dont l'impact non cancérogène sur la santé des enfants était plus grave que celui des autres endroits de la mine. Par conséquent, une attention particulière doit être accordée à ce point de la mine de Tamra.

Le Tableau III.9 présente les résultats des quotients de risque par les différentes voies d'exposition, ainsi que les indices de danger (ID) pour les adultes. Les résultats montrent que l'ID a été trouvé dans l'ordre de Pb > As > Mn > Fe > Zn > Cd. De plus, ces quotients des trois zones étudiées dans la mine varient en fonction de la zone et de l'élément étudié. Le Fe, le Zn et le Pb suivent une tendance décroissante : aval > milieu > amont, tandis que le Mn et le Cd suivent l'ordre suivant : milieu > amont > aval, et enfin l'As suit la hiérarchie suivante : aval > amont > milieu.

Les quotients de risque (QR) du Fe par la voie d'exposition critique (voie par ingestion) ainsi que pour la voie respiratoire dans la plupart des localisations de la mine dépassent largement 1, à l'exception des QR par l'inhalation pour T1, T2 et T9 (QR < 1) (Tableau III.10). Cela pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de la distribution du Fe, ces trois points présentant les concentrations totales les plus faibles pour ce métal (§ 2.1). Par ailleurs, les QR de l'exposition cutanée sont tous inférieurs à 1, ce qui suggère que cette voie d'exposition ne présente pas de risque non cancérogène pour les adultes (USEPA, 1989 ; 2002). De même pour le zinc, les valeurs du QR de la voie par ingestion sont largement supérieures à 1, ce qui suggère que cette voie d'exposition présente des risques non cancérogènes pour les adultes (USEPA, 1989, 2002).

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Cependant, les valeurs QR pour les voies respiratoire et cutanée sont inférieures à la limite de sécurité, avec une observation notable à T1, la zone d'altitude plus élevée de la mine de Tamra, pour laquelle le risque cutané est supérieur au risque respiratoire, mais restant inférieur à la limite de sécurité. Une étude dermatotoxicologique a montré que dans les zones situées à plus haute altitude du site minier, la peau est exposée à un rayonnement UV plus intense et à un air plus sec, ce qui peut entraîner une sensibilité cutanée (Ramos *et al.*, 2022). Cette condition peut favoriser une pénétration accrue des éléments traces, y compris le Zn, même si leur mobilité dans le sol minier est faible, comme le montrent nos résultats d'extraction séquentielle (§ 2.1). Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'effet de l'altitude sur les risques non cancérogènes par voie cutanée. Par ailleurs, les valeurs du QR pour le manganèse pour les trois voies d'exposition chez les adultes sont nettement supérieures au niveau de sécurité ($QR > 1$), ce qui est également le cas chez les enfants. Cela confirme sa grande capacité à traverser diverses barrières biologiques dans les deux groupes d'âge. Pour le Cd, les valeurs QR des voies cutanée et respiratoire sont toutes inférieures à 1, ce qui suggère que ces voies d'exposition ne présentent pas de risques non cancérogènes pour les adultes. Cependant, les valeurs QR pour l'exposition cutanée sont plus élevées que celles pour l'exposition respiratoire ($QR < 1$). Cela pourrait s'expliquer par sa capacité à pénétrer la peau sous forme soluble, comme les sulfates de cadmium, à cause de son affinité avec les protéines soufrées de la peau (Baig *et al.*, 2019). De plus, bien que le Cd soit toxique, son risque respiratoire est fortement lié à la présence de particules ultrafines et à sa concentration dans l'atmosphère (Guo *et al.*, 2021), qui est possiblement plus faible sur ce site. Finalement, les valeurs du QR d'As dans les trois voies d'exposition chez les adultes sont largement supérieures à la limite critique ($QR > 1$), ce qui est également le cas chez les enfants. Des études similaires ont également révélé que l'exposition à ce métalloïde dans les zones minières conduit à des résultats analogues pour diverses voies d'exposition, notamment dans un bassin minier aurifère en Afrique du Sud (Kamunda *et al.*, 2016), un site minier aurifère en Bolivie (Pavilonis *et al.*, 2017) et des zones minières colombiennes (Marrugo-Madrid *et al.*, 2022).

3.3.2. Évaluation des risques cancérogènes

Le Tableau III.11 illustre les résultats des risques cancérogènes (RC) et ceux des risques cancérogènes totaux (RCT) pour les enfants et les adultes de la zone d'étude par les différentes

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

Tableau III. 11. Risques cancérogènes par ingestion, voie respiratoire et contact cutané pour les enfants et les adultes de la zone d'étude : RC : Risque cancérogène ; RCT : Risque cancérogène total.

		Amont de la mine			Milieu de la mine			Aval de la mine			Moyenne	
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9		
Zn	Enfants	RC-ing	6,75E-07	4,47E-07	2,03E-06	5,17E-06	2,36E-06	1,23E-06	1,37E-05	4,35E-06	1,26E-06	3,47E-06
		RC-res	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		RC-cut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		RCT	6,75E-07	4,47E-07	2,03E-06	5,17E-06	2,36E-06	1,23E-06	1,37E-05	4,35E-06	1,26E-06	
	Adultes	RC-ing	0,011	0,007	0,024	0,018	0,021	0,020	0,047	0,034	0,011	0,022
		RC-res	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		RC-cut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		RCT	0,011	0,007	0,024	0,018	0,021	0,020	0,047	0,034	0,011	
	Enfants	RC-ing	2,30E-08	1,44E-08	4,61E-08	2,54E-07	1,10E-07	5,40E-08	5,60E-07	1,23E-06	3,66E-08	1,45E-07
		RC-res	1,59E-09	2,84E-09	3,19E-10	1,76E-08	7,63E-09	3,74E-09	3,88E-08	5,94E-09	2,54E-09	
		RC-cut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		RCT	2,466E-08	1,72E-08	4,93E-08	2,72E-07	1,17E-07	5,76E-08	5,58E-07	1,29E-07	3,92EE-08	
Pb	Adultes	RC-ing	4,50E-06	2,82E-06	9,01E-06	4,97E-06	2,15 E-06	1,05E-05	1,09E-04	1,7 E-05	7,17 E-06	2,46E-05
		RC-res	1,59E-09	2,84E-09	3,19E-10	1,76E-08	7,63E-09	3,74E-09	3,88E-08	5,94E-09	2,54E-09	
		RC-cut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	RCT	4,51 E-06	2,82E-06	9,02E-06	4,97E-06	2,15E-06	1,05E-06	1,06 E-04	1,67E-05	7,17E-06		
Cd	Enfants	RC-ing	1,00E-08	8,06E-09	1,05E-08	1,20E-08	8,70E-09	8,27E-08	8,27E-07	2,82E-07	2,97E-07	2,26E+5
		RC-res	9,06E-11	3,97E-11	1,54E-10	8,65E-12	3,82E-11	1,66E-10	1,71E-10	0	1,12E-10	
		RC-cut	3,26E+5	2,53E+5	3,32E+5	3,74E+5	2,73E+5	2,60E+5	3,14E+5	8,89E+4	9,33E+4	
		RCT	3,15E+5	2,25E+5	3,32E+5	3,74E+5	2,73E+5	2,60E+5	3,14E+5	8,89E+5	9,33E+5	
	Adultes	RC-ing	1,96E-06	1,57E-06	2,06E-06	2,32E-06	1,69E-06	1,61E-06	1,96E-06	5,53E-07	8,15E-05	3,63E+5
		RC-res	8,06E-11	3,98E-11	1,54E-10	8,65E-12	3,82E-11	1,66E-10	1,71E-10	0	1,23E-10	
		RC-cut	3,26E+5	1,02E-05	1,34E-05	1,51E-05	1,10E-05	1,05E-05	1,05-05	2,81E-01	3,38E-05	
		RCT	3,26E+5	1,18E-05	1,55E-05	1,75E-05	1,27E-05	1,21E-05	1,24E-05	2,87E-05	8,53E-05	
	Enfants	RC-ing	8,55E-05	2,07E-03	1,95E-03	7,47E-04	7,64E-04	1,12E-03	1,60E-03	8,18E-04	6,01E-04	2,17E+4
		RC-res	8,06E-11	3,98E-11	1,54E-10	8,65E-12	3,82E-11	1,66E-10	1,71E-10	0	1,23E-10	
		RC-cut	1,96E+6	6,16E-06	8,09E-06	9,10E-05	6,64E-06	6,32E-06	6,32E-06	1,72E-01	2,27E-06	
		RCT	1,96E+5	2,21E-03	1,96E-03	7,89E-04	8,30E-04	1,17E-03	1,67E-03	1,73E-01	6,04E-04	

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

As											
Adultes	RC-ing	2,86E-04	1,93E-04	1,04E-03	4,17E-04	4,26E-04	6,25E-04	8,54E-12	4,57 E-04	3,22E-03	
	RC-res	4,26E-07	2,87E-07	1,55E-06	6,20E-07	6,33E-07	9,28E-07	1,32E-06	6,78E-07	4,78E-07	
	RC-cut	7,26E+6	1,91E-04	1,03E-03	4,13E-04	4,22E-04	6,19E-04	6,19E-04	4,34E+8	3,05E+8	
	RCT	7,26E+6	3,85E-04	2,08E-03	8,32E-04	8,50E-04	1,24E-03	6,20E-04	9,10E-04	6,4E-04	8,06E+6

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

voies d'exposition (ingestion, respiratoire et contact cutané). Les valeurs RC du Cd par ingestion pour tous les sites d'échantillonnage du sol ainsi que celles liées à l'exposition par inhalation au Pb, au Cd et à l'As (à l'exception de T3 et T7) sont toutes inférieures à la limite recommandée de $1,0E-06$ chez les adultes et les enfants (USEPA, 1989 ; 2002). Ces valeurs indiquent qu'il n'existe donc aucun risque cancérigène pour la santé dans ces deux groupes d'âge. Cependant, les valeurs CR pour l'exposition cutanée à l'As chez les adultes et celles pour le Cd chez les enfants présentent un risque potentiel de cancer plus élevé par rapport aux autres éléments étudiés (CR supérieur à $1,0E-04$). Alors que chez les enfants, les valeurs CR pour l'As sont toutes supérieures à $1,0E-06$, à l'exception des sites T1 et T8 où le CR est supérieur au seuil acceptable ($1,0E-04$). Pareillement, les valeurs CR pour le Cd chez les adultes sont toutes supérieures à $1,0E-06$, hormis pour la zone T1, dont le CR correspond à $3,26E+5$. Il convient donc d'accorder une attention particulière à ces endroits (T1 et T8) dans la mine de Tamra. Le risque cancérogène total (RCT) pour l'As chez les enfants et les adultes variait respectivement de $6,04E-04$ à $1,96E+5$ et de $3,83E-04$ à $7,96E+6$, dépassant la valeur seuil acceptable de $1,0E-04$ (USEPA, 1989 ; 2002). Cela signifie que ce métalloïde présente un risque cancérigène plus élevé pour la santé des adultes que pour celle des enfants. Toutefois, le RCT du Cd chez les enfants était compris entre $2,25E+5$ et $9,33E+5$, ce qui est largement supérieur à la valeur seuil. Cela indique que le Cd présente un risque cancérigène accru pour les enfants. Par contre, chez les adultes, le site T1 est le seul qui présente un risque cancérogène ($TCR = 3,26E+5$). De plus, la répartition des valeurs TCR du zinc montre que ce métal est largement supérieur à la valeur limite chez les adultes, allant de 0,007 à 0,047, avec le site T7 représentant la valeur la plus élevée, tandis que chez les enfants, les valeurs sont largement inférieures à la norme. Cependant, les risques cancérigènes pour la santé des enfants et des adultes liés à l'exposition au plomb étaient légèrement inférieurs au seuil. Ainsi, cette étude a montré que les sites T1, T7 et T8 sont principalement concernés par les risques sanitaires cancérogènes. Il convient donc de prêter une vigilance accrue à ces secteurs pour les futurs programmes de remédiation sur le site minier de Tamra. Des études similaires effectuées sur des zones minières de fer en Malaisie, et au Maroc ont montré que l'exposition aux ETM représente des risques cancérogènes (Diami *et al.*, 2016 ; Nouri *et al.*, 2017). Ces estimations des risques sanitaires (cancérogènes et non cancérogènes) sont sujettes à des limites et incertitudes liées notamment aux méthodes d'échantillonnage spatial et temporel, à l'hétérogénéité des sites ainsi qu'à la

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

variabilité individuelle. Afin de réduire ces incertitudes et de renforcer la pertinence des résultats obtenus, des analyses complémentaires seront nécessaires, notamment : *i*) la mise en place d'un suivi des poussières respirables, *ii*) la multiplication des campagnes d'échantillonnage et *iii*) le recours à des modèles avancés qui intègrent la spéciation chimique ainsi que les paramètres physicochimiques du sol. Ceci permet d'estimer la fraction biodisponible réelle et de présenter la variabilité observée.

4. Conclusion et perspectives

La présente étude a porté sur la caractérisation des eaux, l'évaluation de la bioaccessibilité gastrique ainsi que sur l'analyse des risques sanitaires associés aux éléments traces présents dans les sols miniers de Tamra.

Les principaux résultats relèvent que l'As, Mn et Pb constituent des indicateurs critiques de la pollution de l'eau dans cette zone minière en mettant en évidence la nécessité urgente d'une gestion appropriée du milieu aquatique dans la région. La source Aïn El Bell apparaît comme particulièrement vulnérable, nécessitant une gestion urgente. La présence de Cd, As et Pb dans les trois sources d'eau potable étudiées pourrait présenter une menace sérieuse pour la santé des populations locales. Il convient donc d'accorder une vigilance particulière à ces éléments toxiques.

En outre, le test de bioaccessibilité des éléments traces étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) met en évidence l'influence de la composition minéralogique et des propriétés physicochimiques du sol sur leur biodisponibilité dans le milieu gastrique.

Les résultats de l'estimation de risque sanitaire non cancérogène montrent que la voie d'exposition prédominante est l'ingestion pour les deux groupes d'âge (enfants et adultes). Les valeurs de l'indice de danger des éléments examinés soulignent que la population locale de la région de Tamra est exposée à des risques élevés non cancérogènes. Cependant, le risque cancérogène lié à l'arsenic était plus élevé à la fois chez les enfants et les adultes, alors que le Cd présente un risque potentiel chez les enfants et le Zn chez les adultes uniquement.

Ces résultats soulignent la nécessité d'actions prioritaires pour limiter l'exposition humaine et réduire les impacts sanitaires dans la région. Les conclusions de cette étude ouvrent plusieurs pistes de recherche et de gestion : (1) En premier lieu, il sera essentiel d'approfondir la compréhension des mécanismes de contamination par des études de modélisations de la

Chapitre III. Impacts écotoxicologiques de la contamination des sols miniers par les éléments traces métalliques sur la flore endémique et la santé des populations locales

géochimique des éléments traces *via* l'outil PHREEQC, afin d'anticiper leur dispersion et leur impact à long terme ; (2) Parallèlement, il sera utile d'élargir les évaluations des risques sanitaires en intégrant les facteurs de vulnérabilité de la population locale, en particulier sur le plan nutritionnel et de co-exposition à d'autres polluants, et en recourant à des approches biologiques telles que les analyses sanguines et capillaires et la surveillance épidémiologique ; (3) par ailleurs, il est nécessaire de renforcer les mesures de prévention et de sensibilisation telles que des recommandations sanitaires et des consultations en collaboration avec les autorités locales ; (4) la corrélation des résultats obtenus avec ceux d'autres sites miniers similaires (âge géologique, formation et polluants métalliques) permettrait de mieux comprendre la spécificité de ce site et d'identifier des solutions transférables ; Finalement (5) la mise en place de stratégies de remédiation innovantes, notamment la phytostabilisation assistée par du biochar, constitue également une piste prometteuse pour stabiliser les polluants et réduire par conséquent les risques sanitaires et environnementaux.

**Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée
: Expérience en pots**

Introduction au chapitre IV

Les caractérisations antérieures du site minier de Tamra, tant sur les plans agronomique, environnemental que sanitaire, ont révélé la nécessité de limiter les apports et de stabiliser les éléments traces métalliques (ETM) dans le sol tout en favorisant les processus de phytoremédiation. Toutefois, un défi supplémentaire résulte de l'intensification du stress hydrique accentué par les conditions de sécheresse. Ce stress combiné peut limiter considérablement l'efficacité des techniques de remédiation. Afin de limiter la mobilité, la biodisponibilité et l'impact environnemental des ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As), la phytostabilisation a été retenue comme stratégie de réhabilitation des sols contaminés dans un environnement marqué par la sécheresse. Cette technique, respectueuse de l'environnement et économiquement viable comparée aux approches conventionnelles, permet de réduire la mobilité des ETM et leur transfert vers les nappes phréatiques et la chaîne trophique (Hammond *et al.*, 2022). Son efficacité reste néanmoins tributaire de la capacité des espèces végétales candidates à tolérer les stress dus à la toxicité des ETM.

Casuarina glauca, espèce ligneuse à croissance rapide, a été sélectionnée pour évaluer son potentiel de phytostabilisation des sols miniers de Tamra. Ce choix s'appuie sur ses remarquables capacités d'adaptation écologique, notamment sa tolérance élevée aux stress abiotiques sévères (Béjaoui *et al.*, 2008) et son efficacité dans l'immobilisation des ETM (Ghazouani *et al.*, 2020 ; Slaimi *et al.*, 2021, 2022). Espèce actinorhizienne particulièrement adaptée à la réhabilitation des sols dégradés, *C. glauca* développe un système racinaire dense et étendu. Sa symbiose avec *Frankia* spp., responsable de la formation de nodules fixateurs d'azote (Ghazouani *et al.*, 2020), constitue un atout majeur renforçant sa résilience face aux contraintes abiotiques (Batista Santos *et al.*, 2015). Cette espèce déploie une stratégie d'exclusion des ETM reposant sur *i*) une bioaccumulation racinaire préférentielle pour de multiples ETM (Pb, Cr, As, Cd, Cu, Zn, Ni), et *ii*) une translocation faible vers les tissus aériens (Ghazouani *et al.*, 2020 ; Slaimi *et al.*, 2021, 2022). Sa tolérance aux stress hydriques et salins, combinée à sa capacité à stabiliser les sols pauvres et contaminés dans les régions méditerranéennes de climat semi-arides à arides soumises à un déficit hydrique (Ghazouani *et al.*, 2020 ; Slaimi *et al.*, 2021, 2022), en fait un candidat idéal pour la phytostabilisation des sols en Tunisie notamment dans le nord du pays, incluant les zones minières dégradées.

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

Malgré ce potentiel, la performance de *C. glauca* peut être influencée par les caractéristiques du sol et la nature des polluants. C'est pourquoi l'ajout de biochar, comme amendement organique, constitue une approche complémentaire visant à renforcer l'efficacité de cette technique.

En effet, l'optimisation de la phytoremédiation repose sur l'exploitation ciblée des mécanismes biologiques. L'amendement à l'aide de biochar, matrice carbonée poreuse (Fatah & Sadiq, 2025), constitue une stratégie synergique puissante pour les amplifier. Son action repose sur trois mécanismes clés : i) l'immobilisation des polluants grâce à sa forte capacité de sorption, réduisant la lixiviation et la biodisponibilité des contaminants (notamment les ETM), limitant leur transfert vers les eaux souterraines et leur phytotoxicité (Wang *et al.*, 2024) ; ii) l'amélioration de la rhizosphère par la modification de la structure du sol, l'accroissement de la rétention hydrique et la disponibilité des nutriments (N, P, K), stimulant ainsi la croissance racinaire et la tolérance des plantes (Barčauskaitė *et al.*, 2023 ; Han *et al.*, 2024) et iii) son rôle de support microbien en tant que substrat écologique qui favorise l'abondance, la diversité et les activités enzymatiques des communautés microbiennes bénéfiques (Timofeeva *et al.*, 2022). L'optimisation des propriétés du biochar (porosité, pH, groupes fonctionnels) selon le type de contaminant et l'espèce végétale est cruciale pour maximiser la synergie plante-microbe-biochar et développer des systèmes de réhabilitation durables.

Dans le cadre de cette étude, notre choix s'est porté sur le biochar dérivé d'écorce d'*Eucalyptus* qui agit comme un modulateur rhizosphérique synergique ; en améliorant les propriétés physico-chimiques du sol (fertilité, structure et rétention hydrique), il favorise simultanément i) les interactions plante-microorganismes bénéfiques pour *C. glauca* et ii) la tolérance aux ETM/stress hydrique via l'optimisation des fonctions écophysiologiques. En effet, cette interaction avec les ETM repose sur sa composition chimique du biochar qui contient des niveaux élevés de cellulose, d'hémicellulose et de lignine (Fernandes *et al.*, 2020 ; Lu *et al.*, 2021). Ces composés organiques comportent des groupes carboxyles, hydroxyles et phénoliques qui peuvent former des complexes stables avec les ions métalliques (Lu *et al.*, 2021). Par ailleurs, les groupes fonctionnels présents à sa surface peuvent interagir avec les cations métalliques par des liaisons d'hydrogène, par échanges ioniques et par interactions électrostatiques, réduisant ainsi la biodisponibilité des ETM dans le sol (Shafiq *et al.*, 2021). Cette multifonctionnalité confère au biochar un rôle de premier plan pour réhabiliter les sols

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

miniers, combinant réduction de la biodisponibilité des polluants et restauration des services écosystémiques. De plus, bien que certains biochars présentent une plus forte capacité à retenir les ETM, celui d'*Eucalyptus* est largement disponible en Tunisie (Saadaoui *et al.*, 2022), ce qui le rend plus facile à se procurer et moins coûteux.

Bien que le biochar possède un potentiel remarquable pour améliorer la phytostabilisation, son efficacité reste limitée pour plusieurs raisons, notamment : 1) dans certains cas, il peut libérer les ETM, ce qui peut engendrer des problèmes environnementaux et sanitaires (Fang *et al.*, 2025) ; 2) son efficacité varie en fonction de ses propriétés, des caractéristiques du sol et du métal en question, ce qui rend son application dépendante de chaque situation spécifique (Nguyen *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2024) ; 3) son utilisation à grande échelle est limitée par des préoccupations liées à son efficacité à long terme (Wu *et al.*, 2024) ; et finalement 4) l'interaction complexe sol-éléments traces- biochar reste encore peu comprise et dépend de plusieurs facteurs (Nguyen *et al.*, 2023). Ces constats soulignent la nécessité des recherches supplémentaires adaptées à chaque situation spécifique.

Dans ce contexte, cette étude poursuit les objectifs suivants :

- Quantifier la résilience écophysologique de plants de *Casuarina glauca* dans le sol minier de Tamra (contaminé par Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, As) ;
- Démontrer le rôle modulateur du biochar d'*Eucalyptus* dans l'atténuation des stress multiples ;
- Évaluer l'efficacité globale de la phytostabilisation assistée.

Cette partie est présentée sous la forme d'un article intitulé "Eucalyptus-Biochar Application for Mitigating the Combined Effects of Metal Toxicity and Osmotic-Induced Drought in *Casuarina glauca* Seedlings", publié dans la revue scientifique *Land*.

1. Résumé de la publication

La phytostabilisation assistée par le biochar représente une stratégie écologique prometteuse pour la réhabilitation des sols contaminés par les éléments traces métalliques (ETM). En améliorant les propriétés physico-chimiques du sol, le biochar favorise l'immobilisation des ETM, réduit leur biodisponibilité et limite leur transfert vers l'écosystème, tout en soutenant la croissance végétale et l'activité microbiologique du sol. Son efficacité repose toutefois sur le

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

choix judicieux du biochar ajouté. Le site minier d'extraction de fer de Tamra se distingue par des fortes concentrations en ETM notamment le Fe, le Zn, le Mn, le Pb, le Cd et l'As, ainsi que par la présence de trois sources d'eau (Aïn El Bell, Aïn El Rechech, Aïn El Mota) destinées aux communautés locales. Ces caractéristiques engendrent des impacts écotoxicologiques majeurs et des risques pour la santé humaine. Face à ces enjeux, ce site minier constitue un terrain particulièrement privilégié pour l'étude de la phytoremédiation.

Dans ce contexte, cette étude vise à évaluer l'efficacité d'une approche combinée associant *Casuarina glauca*, espèce tolérante aux contraintes environnementales, et un biochar dérivé d'*Eucalyptus* (EuB), dans un contexte méditerranéen soumis à un stress hydrique accru. L'objectif principal est d'apprécier les effets de cette combinaison sur les caractéristiques écophysiologiques de la plante, la dynamique des ETM présents et leur toxicité.

Pour ce faire, des plantules de *C. glauca* ont été cultivées pendant 6 mois, dans trois substrats différents : (1) un sol non minier (NMS) situé à 11 km de la mine de Tamra, (2) un sol contaminé collecté sur la mine de Tamra (CS) et (3) ce même sol contaminé de la mine de Tamra amendé par 5 % (m/m) de biochar dérivé d'*Eucalyptus* (CS + EuB). Cette approche vise essentiellement à étudier le comportement de *C. glauca* vis-à-vis d'un sol contaminé par les ETM dans des conditions contrôlées. Plusieurs paramètres écophysiologiques ont été mesurés afin d'évaluer la croissance des plantules, les échanges gazeux, la relation hydrique, le stress oxydatif ainsi que l'accumulation dans leurs tissus des éléments traces étudiés.

Les résultats montrent que l'ajout de biochar (EuB) améliore significativement la croissance de *C. glauca* en augmentant de 14 % la biomasse sèche totale par rapport au sol contaminé non amendé (CS). De plus, ce biochar permet d'améliorer le taux de photosynthèse nette, le potentiel hydrique et l'efficacité d'utilisation de l'eau de 22 %, 27 % et 18 % respectivement par rapport à CS. Par ailleurs, le biochar a permis de réduire les effets du stress oxydatif chez *C. glauca* tout en atténuant les concentrations de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de malondialdéhyde (MDA), de proline (Pro) et de fuite d'électrolyte (EL).

Sur le plan de la mobilité des contaminants, le biochar EuB a fortement réduit la biodisponibilité du Fe (-71 %) tout en augmentant celle du Zn, Mn et Pb. Sur le plan de la phytoaccumulation des éléments traces, *C. glauca* a montré sa forte capacité d'hyperaccumulation de tous les éléments étudiés dans ses parties aériennes à l'exception de Mn. Ces éléments dépassent largement les seuils critiques d'hyperaccumulation : Fe > 10 000 $\mu\text{g/g}$, Zn > 3000 $\mu\text{g/g}$, Pb >

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

1000 µg/g, Cd > 100 µg/g et As > 1000 µg/g. Une accumulation exceptionnelle de Fe (85 760 µg/g) a été enregistrée en présence de EuB.

Le biochar dérivé d'*Eucalyptus* a également amélioré le développement des nodules racinaires symbiotiques, lesquels jouent le rôle de « puits » en particulier pour Zn, Mn, Pb, et Cd. Enfin, l'analyse des composantes principales (ACP) a confirmé l'effet positif du biochar, en dissociant la biodisponibilité des éléments traces examinés dans le sol et leurs impacts physiologiques sur les plantules.

Ces résultats mettent en lumière le potentiel de la combinaison *C. glauca* - biochar d'*Eucalyptus* comme stratégie efficace de phytostabilisation pour réhabiliter les sols miniers dans des conditions contrôlées, en particulier sous stress hydrique. Ce couplage contribue non seulement à améliorer l'immobilisation de Fe, Pb et As mais aussi à renforcer la tolérance physiologique de la plante aux stress combinés liés à la contamination métallique et à la sécheresse. Il a renforcé également la phytostabilisation par l'accumulation des éléments traces dans les nodules symbiotiques. Cette approche s'inscrit dans une logique d'économie circulaire tout en répondant aux enjeux de durabilité et de sécurité environnementale. Cependant, sa pérennité, sa rentabilité et son applicabilité en conditions réelles doivent être validées. À cette fin, un essai en plein champ sur le site minier de Tamra a été lancé en mars 2025 sur le site minier de Tamra pour évaluer directement la durabilité et l'efficacité à long terme de cette solution innovante.

***Eucalyptus*-Biochar Application for Mitigating the Combined Effects of Metal Toxicity and Osmotic-Induced Drought in *Casuarina glauca* Seedlings**

Oumaima Ayadi ^{1,2,3}, Khawla Tlili ^{1,4}, Sylvain Bourgerie ^{3,*} and Zoubeir Bejaoui ^{1,2}

1 Faculty of Sciences of Bizerte, University of Carthage, Bizerte 7021, Tunisia;

ayadi.oumaima@fsb.ucar.tn (O.A.); khawla.tlili@fsb.ucar.tn (K.T.); zoubeir.bejaoui@fsb.ucar.tn (Z.B.)

2 Laboratory of Forest Ecology (LR11INRGREF03), National Institute of Research in Rural Engineering, Water and Forests (INRGREF), Ariana 2080, Tunisia

3 University of Orleans, Laboratory Physiology, Ecology and Environment (P2E), UR 1207—USC INRAE 1328, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orleans Cedex 2, France

4 Faculty of Sciences of Tunisia, University of Tunis, Elmanar, LEBPAO, Tunis 1068, Tunisia

* Correspondence: sylvain.bourgerie@univ-orleans.fr

Abstract

Land degradation from trace metal pollution in North Africa severely compromises soil fertility. This study investigates the synergistic remediation potential of *Eucalyptus* biochar (EuB) and *Casuarina glauca* in iron mine soil contaminated with Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, and As. Seedlings were grown for six months in: non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and CS amended with 5% EuB (CS + EuB). Comprehensive ecophysiological assessments evaluated growth, water relations, gas exchange, chlorophyll fluorescence, oxidative stress, and metal accumulation. EuB significantly enhanced *C. glauca* tolerance to multi-trace metal stress. Compared to CS, CS + EuB increased total dry biomass by 14% and net photosynthetic rate by 22%, while improving predawn water potential (from -1.8 to -1.3 MPa) and water-use efficiency (18%). Oxidative damage was mitigated. EuB reduced soluble Fe by 71% but increased Zn, Mn, Pb, and Cd mobility. *C. glauca* exhibited hyperaccumulation of Fe, Zn, As, Pb, and Cd across treatments, with pronounced Fe accumulation under CS + EuB. EuB enhanced nodule development and amplified trace metals sequestration within nodules (Zn: $+1.4\times$, Mn: $+2.4\times$, Pb: $+1.5\times$, Cd: $+2.0\times$). The EuB- *C. glauca* synergy enhances stress resilience, optimizes rhizosphere trace metals bioavailability, and leverages nodule-mediated accumulation, establishing a sustainable platform for restoring contaminated lands.

Keywords: iron mine; trace metal stress; drought induced stress; *Casuarina glauca*; *Eucalyptus*-biochar; nodule metal accumulation; phytoremediation

2. Introduction

Globally, over 10% of agricultural soils in mining regions exhibit trace-metal concentrations exceeding recommended safety thresholds annually [1]. Excessive levels of these contaminants threaten ecosystem resilience and global food security [2], while also posing a significant health hazard [3]. Furthermore, they severely impact soil fertility by altering the soil's biological, chemical, and physical properties [4]. North Africa experiences the most severe land degradation and desertification globally, driven primarily by accumulating harmful trace metals

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

in the soil [5]. The environmental risks linked to soil pollution by trace metals (TM) are particularly acute in the North of Tunisia [6], where both active and legacy mining operations have been abandoned in the absence of any environmental safeguards [7,8]. These mine sites represent a significant source of contamination for surrounding agricultural soils [9]. For example, Nouairi et al. [10] showed high levels of Pb and Zn, in agricultural soils exposed to mining waste reaching 28,040 mg·kg⁻¹ and 94,420 mg·kg⁻¹, respectively. Similarly, Mabrouk et al. [11] have detected Ni levels of 101 mg·kg⁻¹, while Achour et al. [12] have revealed contamination of Cd (64 mg·kg⁻¹), As (669 mg·kg⁻¹), and Sb (145 mg·kg⁻¹). In Tunisia's Mediterranean climate, mining sites face rehabilitation challenges due to the complex interplay between soil contamination and edaphic drought, complicating effective land rehabilitation efforts. Under such conditions, drought suppresses microbial activity [13], thereby diminishing soil fertility and constraining plant growth [14,15], both of which are critical for effective phytoremediation. Several researches have extensively explored phytoremediation under optimal growing conditions, yet the synergistic impacts of edaphic drought and trace metal-contaminated soils remain less studied.

Trace metals can infiltrate water sources through wind dispersal and runoff, leading to the contamination of both surface water and groundwater [16]. Given their persistent nature and toxicity even at low concentrations [17], addressing TM contamination necessitates sustainable remediation strategies to restore environmental balance [18]. The excessive accumulation of TM in soils exerts phytotoxic effects once absorbed by plants, leading to reduced biomass production and impaired water uptake [19]. This metal-induced stress triggers the overgeneration of reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative damage and physiological and biochemical disruptions [20]. This perturbation compromises enzymatic processes, destabilizes membranes, impairs photosynthetic activity, and damages cellular structures [21]. Plants have evolved intrinsic defense mechanisms to mitigate TM-induced stress, including stress-responsive gene activation [22], antioxidant enzyme regulation [23], and enhanced proline synthesis [24]. However, in highly polluted environments, these natural defenses are often insufficient, necessitating external interventions to enhance plant resilience and metal immobilization [19].

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

Rehabilitating degraded mine lands using appropriate tree species with soil wood amendments can efficiently be applied as a promising strategy for establishing a green cover. Actinorhizal trees, such as *Casuarina glauca*, are particularly promising due to their ability to establish symbiotic relationships with nitrogen-fixing bacteria, which significantly enhance soil fertility [25,26,27]. *C. glauca*, a model actinorhizal species, has shown promising adaptability to degraded soils beyond its native range [28]. It offers considerable potential for enhancing drought tolerance and rehabilitating soils contaminated with trace metals [27,29]. Effective phytoremediation requires plant species possessing extensive root systems, rapid growth rates, high tolerance to a multitude of abiotic stresses, and the capacity to uptake, translocate, and sequester trace metals [30,31]. Nonetheless, its capacity to remediate sites exposed simultaneously to TM contamination and drought-induced osmotic stress remains insufficiently explored. Numerous studies have highlighted the synergistic benefits of integrating phytoremediation with biochar amendment to remediate TM contaminated soils under drought conditions [32,33]. Biochar, generated via the pyrolysis of plant biomass, represents a cost-effective soil amendment that enhances water-retention capacity, thereby mitigating plant water stress during periods of drought [34,35]. Its highly porous architecture facilitates the adsorption and gradual release of water and nutrients to the rhizosphere [36], promoting improved plant growth and drought resilience. Moreover, biochar incorporation has been shown to elevate soil organic matter levels and stimulate microbial activity, further supporting soil health and remediation efficacy [37,38]. Biochar's high cation exchange capacity, and alkaline pH make it a powerful adsorbent, reducing metal mobility and toxicity in contaminated soils [39]. Biochar can improve soil stability and structure, helping to prevent erosion [40]. It also creates pores in the soil, improving aeration, drainage and root penetration [41]. However, the efficacy of biochar in TM stabilization depends on its feedstock composition, with woody biomass-derived biochars demonstrating superior adsorption properties [42]. *Eucalyptus*-derived biochar has shown promise in TM remediation due to its high cellulose content, which enhances adsorption capacity [43,44]. The biochar employed here exhibits a neutral to mildly alkaline pH, pronounced porosity, and minimal ash content [45,46]. These physicochemical attributes improve soil aggregation and water-holding capacity, thereby enhancing nutrient bioavailability and uptake by plants [47]. Moreover, biochar application markedly decreases the bioavailability and plant assimilation of TM, effectively limiting their entry into the food

chain [43,48]. Given these properties, incorporating *Eucalyptus* biochar into contaminated soils could offer a viable strategy to improve the phytoremediation efficacy of *C. glauca*, promote plant growth, and mitigate secondary contamination risks through the stabilization of eroded soils.

This study targets six trace metals (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, As) prevalent at the Tamra iron mine site due to ore weathering and tailing dispersal [7]. Iron (Fe) constitutes the main trace metal in the ore mined. Zinc (Zn) and manganese (Mn) represent common geochemical co-occurring metals in iron formations, while lead (Pb), cadmium (Cd), and arsenic (As) are secondary contaminants [7]. These latter elements are prioritized by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) due to their high toxicity, environmental mobility, and bioaccumulation potential [2,4,12,19]. Collectively, they provide a representative model to evaluate remediation strategies for restoring soil health and ecosystem function in degraded mining landscapes. In this study, we assess the effectiveness of *Eucalyptus*-derived biochar in enhancing the physiological and biochemical resilience of *C. glauca* subjected concurrently to TM contamination and drought-induced osmotic stress in mining-impacted soils. By elucidating the underlying mechanisms of biochar-assisted phytoremediation, we provide critical insights for the sustainable reclamation of heavily polluted mining sites and facilitate the broader implementation of this integrated environmental-restoration strategy.

2. Materials and Methods

2.1. Soils, Plant Material, Experimental Design, and Growth Conditions

The study area is the iron mining site of “Tamra” located 130 km N-W of the Tunisian capital (37°03'12.8" N, 9°06'03.04" E). The region is characterized by a humid climate [49]. Contaminated soil (CS) samples were collected from the Tamra mine land. Several points were randomly sampled across the site and mixed to obtain a composite soil sample. Non-mining soil (NMS) was collected from a non-mining area (37°02'54" N, 8°58'48" E), located 11 Km of the mine. The soil was collected from a depth of 20 cm after removing the upper layer. It then was dried at room temperature and passed through a 2-mm mesh sieve. A portion of the contaminated soil was amended with 5% biochar (CS + EuB) (w/w). The biochar used was obtained by pyrolysis of *Eucalyptus* bark biomass and sieved to 2 mm. Trace metals concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES, **Table 1**). The other physicochemical characteristics of the non-

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

mining soil (NMS), the contaminated soil of Tamra (CS) and the contaminated soil with biochar (CS + EuB) are presented in **Table 1**.

Table 1. Physicochemical characterizations of soils.

Parameter		NMS	CS + EuB	CS
pH (H ₂ O)		7.81 ± 0.01 b	8.25 ± 0.005 a	7.41 ± 0.012 c
EC (μS·cm ⁻¹)		53.50 ± 0.389 c	133.80 ± 0.060 a	70.80 ± 0.120 b
P (%)		30.96 ± 0.016 c	36.51 ± 1.723 b	40.33 ± 0.007 a
K (cm.h ⁻¹)		0.84 ± 0.008 a	0.34 ± 0.018 c	0.39 ± 0.004 b
Ss (m ² .g ⁻¹)		1 ± 0.057 c	20.36 ± 0.023 a	18.13 ± 0.069 b
Particle size distribution (%)	Sand	22.40	nd	65.45
	Silt	21.06	nd	14.80
	Clay	52.67	nd	19.45
Pseudototal concentration (mg/kg; DW)	Fe	7605.14 ± 328.12 b	164,242.66 ± 4776.18 a	173,010.44 ± 1648.42 a
	Zn	48.75 ± 4.81 b	4037.46 ± 47.97 a	4028.82 ± 72.47 a
	Mn	221.39 ± 22.87 d	17,848.09 ± 521.02 b	14,742.55 ± 384.35 c
	Pb	55.30 ± 3.27 b	4480.19 ± 307.08 a	4402.05 ± 89.66 a
	Cd	5.04 ± 0.09 b	8.84 ± 0.06 a	8.41 ± 0.23 a
	As	60.86 ± 1.84 b	476 ± 2.96 a	447.50 ± 14.98 a

Non-mining soil (NMS), contaminated soil with biochar (CS + EuB) and contaminated soil (CS): Hydrogen potential of water (pH (H₂O)), electrical conductivity (EC), Porosity (P), permeability (K), specific surface (Ss), organic matter (OM), Iron (Fe), Zinc (Zn), Manganese (Mn), Lead (Pb), Cadmium (Cd), and Arsenic (As), not determined (nd). Results are expressed as the mean value ± standard error (n = 3). Means followed by different letters indicate statistical differences at $p \leq 0.05$, according to Fisher's LSD (least significant difference) tests.

The physicochemical characteristics of the biochar were determined by standard methods [50]. It is characterized by alkaline pH (8.9), Electrical Conductivity (EC) of 46.5 μS/cm, specific area of 20.9 m².g⁻¹, and elemental composition of carbon, hydrogen, nitrogen are 67.6%, 2.4% and 0.6%, respectively.

The experiment was conducted at the National Institute of Research in Rural Engineering, Water, and Forests (INRGREF) in Tunis (Tunisia).

Casuarina glauca Sieb. ex-Spreng seedlings were produced from seeds at the forest nursery (El Agba) in north-west Tunisia. The seedlings were selected on the basis of their morphological homogeneity, with a height of around 80 cm and a root collar diameter of around 5 mm. The selected seedlings were transplanted into pots (25 cm × 26 cm × 22 cm) that were filled with non-mining (NMS), the contaminated (CS) and the contaminated with biochar (CS + EuB) soil at the rate of 10 kg of soil/pot (one seedling/pot). The pots containing the seedlings of the three treatments were grown for 6 months and they were arranged in a randomized complete block design (RCBD) with five blocks, each containing four seedlings per treatment. Five replicates of different treatments were randomly placed in each block. For each pot, soil moisture was maintained at 80% field capacity throughout the experiment to avoid leaching of

mineral and trace metals using Time Domain Reflectometry (Trase system I, soil moisture equipment Corp., Goleta, CA, USA).

2.2. Determination of Photosynthetic Gas Exchange, Water Use Efficiency, Chlorophyll Fluorescence and Total Dry Mass

Photosynthetic gas exchange variables were measured for five seedlings/treatment. Measurements were carried out at the end of six months, between 09:30 and 11:30 solar time to ensure maximum photosynthetic assimilation [51]. Net photosynthetic rate (P_n), transpiration rate (T_r), stomatal conductance (g_{sw}), and intercellular CO_2 concentration (C_i) were measured using an infrared analyzer (LCpro+, ADC bio Scientific Ltd., Hoddesdon, UK) with a cylindrical coniferous cuvette at an active photosynthetic photon flux density of $984 \pm 56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a CO_2 concentration of $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, and a leaf temperature of $29 \pm 4^\circ\text{C}$ [52]. Measurements were performed on healthy, fully developed needles from the apical region of each treatment group. Each value represents the mean of 12 replicates. All gas exchange parameters were measured at the same levels. Water use efficiency (WUE) was calculated as the ratio of net photosynthesis to transpiration [53].

Chlorophyll fluorescence was measured on the same seedlings used for gas exchange measurements using a fluorometer (LCpro-SD, ADC Bioscientific Ltd., Hertfordshire, UK). Measurements of minimum (F_0) and maximum (F_m) chlorophyll were carried out on attached needles after 30 min of dark adaptation [54]. Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m) was calculated as follows:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (1)$$

After six months of growth, *C. glauca* seedlings were harvested and washed rinsed with distilled water to remove soil and biochar particles. Shoots and roots were separated and then dried at 40°C for 72 h to determine total dry mass (TDM) [55], then preserved for trace metal analysis. For the root part, nodules were collected, dried in the same conditions for the determination of morphological aspect and TM.

2.3. Determination of Chlorophylls and Carotenoids Contents

Chlorophyll content was determined after six months according to the method described by [56,57]. Fresh needles (100 mg) were homogenized in 10 mL of 85% acetone. The filtered

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

solutions were incubated in the dark to avoid photooxidation at 4 °C. After 48 h, the chlorophyll a (Chl a), chlorophyll b (Chl b), total chlorophyll (Tchl) and carotenoids (Car) contents were measured using a spectrometer (Perkin Elmer/UV/VIS model, lambda 25), which were calculated as follows:

$$\text{Chl a (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ FW)} = 9.784 \times A_{662} - 0.99 \times A_{644} \quad (2)$$

$$\text{Chl b (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ FW)} = 21.42 \times A_{644} - 4.65 \times A_{662} \quad (3)$$

$$\text{Tchl (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ FW)} = \text{Chl a} + \text{Chl b} \quad (4)$$

$$\text{Car (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ FW)} = (1000 \times A_{470} - 1.90 \text{ Chl a} - 63.14 \text{ Chl b})/214 \quad (5)$$

where A_{662} , A_{644} and A_{470} are the absorbance measured at 662, 644 and 470 nm, respectively.

2.4. Determination of Water Status

Relative water content (RWC) was determined as in [58]. After recording fresh weight (FW), needles were immersed in distilled water at 4 °C and in the dark for 48 h, blotted dry and then weighed to get the turgid weight (TW). Needles were then dried in an oven at 80 °C for 48 h to determine the dry weight (DW). RWC was calculated according to [59] as follows (6):

$$\text{RWC (\%)} = [(FW - DW)/(TW - DW)] \times 100 \quad (6)$$

Predawn water potential (Ψ_{pd}) was measured via the scholander pressure chamber technique (model 600, PMS Instrument Company, Albany, OR, USA) on young, fully developed *C. glauca* needles. The freshly harvested needle was inserted into a gas-tight stopper, with the served end protruding a few mm from stopper. When sealed in the chamber pressure was applied and controlled until sap was expressed from the surface of the cut stem.

2.5. Determination of Plant Biochemical Responses

Hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration was determined according to the method described by [60] using 5 seedlings for each treatment. Fresh needles (0.3 g) were cold homogenized in 2 mL of 0.1% trichloroacetic acid (TCA) solution (w/v). The homogenate was then centrifuged at $7500\times g$ at 4 °C for 15 min. 0.5 mL of the supernatant was added to 0.5 mL of 100 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate buffer (pH = 7) and 1 mL of potassium iodide (1 M). The absorbance was measured at 390 nm via the UV spectrophotometer (UV 1200 Model, Tomos

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

Life Science Group Pte, Ltd., Shanghai, China), then H_2O_2 concentration was calculated as follows:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] (\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}) = (\text{A}_{390} \times \text{volume of supernatant, mL}) / [(\text{sample fresh weight, g}) / (\text{volume of TCA, mL})] \quad (7)$$

Malondialdehyde (MDA) concentration, a marker of lipid peroxidation, was measured according to the method described by [61]. One gram of fresh leaf was milled in the presence of 10 mL of extraction buffer consisting of 0.5% thiobarbituric acid (TBA), 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.2 mM EDTA. The mixture was incubated in water bath at 95 °C for 25 min then centrifuged at 1000 rpm for 10 min. The absorbance of the supernatant was determined at 532 nm and 600 nm against a blank using a same UV spectrophotometer. MDA concentration was calculated as follows [62], with an extinction coefficient of $155.000 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-1}$:

$$\text{MDA (nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{FW)} = [(\text{A}_{532} - \text{A}_{600}) / 155000] \times 10^6 \quad (8)$$

where A_{532} , and A_{600} are absorbance values measured at 532 nm and 600 nm, respectively.

The determination of enzymatic activities for catalase and guaiacol peroxidase was performed after six months using five seedlings for each treatment.

Catalase (CAT) activity was determined by monitoring H_2O_2 decomposition at 240 nm ($\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) according to the method described by [63]. Each unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required by to break down 1 μmol substrate per min at 25 °C. Guaiacol peroxidase (GPOX) activity was measured according to the method described by [64]. The reaction mixture consisted of 50 mM of phosphate buffer (pH = 7), 9 mM of guaiacol solution and 19 mM of H_2O_2 [65]. The reaction starts upon addition of the enzyme extract to the prepared solution. The kinetics of tetraguaiacol formation from guaiacol was measured at 470 nm for 1 min and its extinction coefficient ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was used for the calculation of GPOX activity. One unit was determined by the amount of enzyme required to produce 1 μmol guaiacol per min at 25 °C. Proline (Pro) content was measured according to the method described by [66]. One hundred milligrams of fresh leaf were milled in 5 mL of 40% methanol (v/v) and the mixture was incubated in water bath at 80 °C for 1 h. After cooling, 1 mL of the mixture was added to 1 mL of acetic acid, 25 mg of ninhydrin and 1 mL of a solution composed of 30 mL orthophosphoric acid 300 mL acetic acid, and 120 mL distilled water. This mixture was incubated in water bath (100 °C) for 30 min. After cooling, 5 mL of toluene were added to the samples. The absorbance of sample was determined at 520 nm using

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

a UV spectrophotometer (UV 1200 Model, Tomos Life Science Group Pte, Ltd., Shanghai, China). The concentration of proline was calculated using the standard curve.

Electrolyte leakage (EL), reflecting membrane integrity was measured according to the method described by [67]. Needles were cut into 1 cm long fragments. These fragments were washed twice with distilled water and then were placed in sterile tubes containing 15 mL of distilled water in the dark at 40 °C for 1 h. The conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) was measured before (C1) and after (C2) heat treatment (100 °C for 1 h) using a conductivity meter (Cellox 325, Multiline P3 PH/LF, WTW GmbH, Weilheim, Germany). EL was calculated as follows:

$$\text{EL (\%)} = (\text{C1/C2}) \times 100 \quad (9)$$

2.6. Trace Metals Concentrations in *Casuarina Glauca* Organs and Phytoremediation Indices

Shoots, roots, and nodules of three seedlings from each treatment (previously separated and dried at 40 °C for 72 h) were ground to a fine powder. Two hundred milligrams of the sample were digested in 9 mL of acid mixture (1:3 v/v ratio of HNO_3 , 65%, and HCl , 37%) using a microwave digestion system (Multiwave 3000; Anton Paar GmbH, Ostfildern, Germany). The process included a 15-min heating phase at 180 °C, holding for 15-min and cooling for other 15-min. The digestion products were diluted and filtered through a 45 μm nitrocellulose filter [68]. Trace metals concentrations (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, and As) were determined by ICP-AES (ULTIMA 2, HORIBA, Labcompare, San Francisco, CL, USA) following instrument calibration. Trace metal composition was expressed as content (concentration $\times$ dry biomass) per seedling to accurately reflect uptake and accumulation [19]. Additionally, TM fractions (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, and As) were determined using a sequential extraction procedure based on the BCR (European Community Bureau of Reference) method described by [69]. The final bioavailable concentration (FBC) was defined as the concentration of TM in the exchangeable fraction of the BCR sequential extraction procedure.

Bioconcentration factor (BCF) and translocation factor (TF) were used to assess Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, and As uptake and distribution in *C. glauca* seedlings. These metrics reflect the plant's efficiency in accumulating and translocating trace metals [70]. Trace metals concentration in soil corresponds to the bioavailable fraction determined by sequential extraction [71]. BCF and TF were calculated as follows:

BCF = Trace metals concentration in plant/Trace metals concentration in soil (10)

TF = Trace metals concentration in shoots/Trace metals concentration in roots (11)

2.7. Statistical Analysis

All data were subjected to one-way ANOVA using Statistic software version 8.0 (Analytical Software, McKinney, TX, USA). Mean separations among treatments were performed with Fisher's protected Least Significant Difference (LSD) test at $p < 0.05$. Values are presented as the means $\pm$ standard error (SE). Principal component analysis (PCA) was conducted using Statistic Kingdom to explore relationships between concentrations of TM in soils and measured plant parameters.

3. Results

3.1. Total Dry Mass, Gas Exchanges, Chlorophyll Fluorescence and Chlorophyll Content

Under contaminated soil conditions, *C. glauca* seedlings showed a significant decrease 27% in TDM compared to NMS ($p < 0.0001$; **Figure 1a**). However, the addition of EuB to contaminated soil (CS + EuB) reduced the severity of this reduction. Seedlings cultivated in CS + EuB showed a 14% improvement in TDM compared to the CS treatment (**Figure 1a**).

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

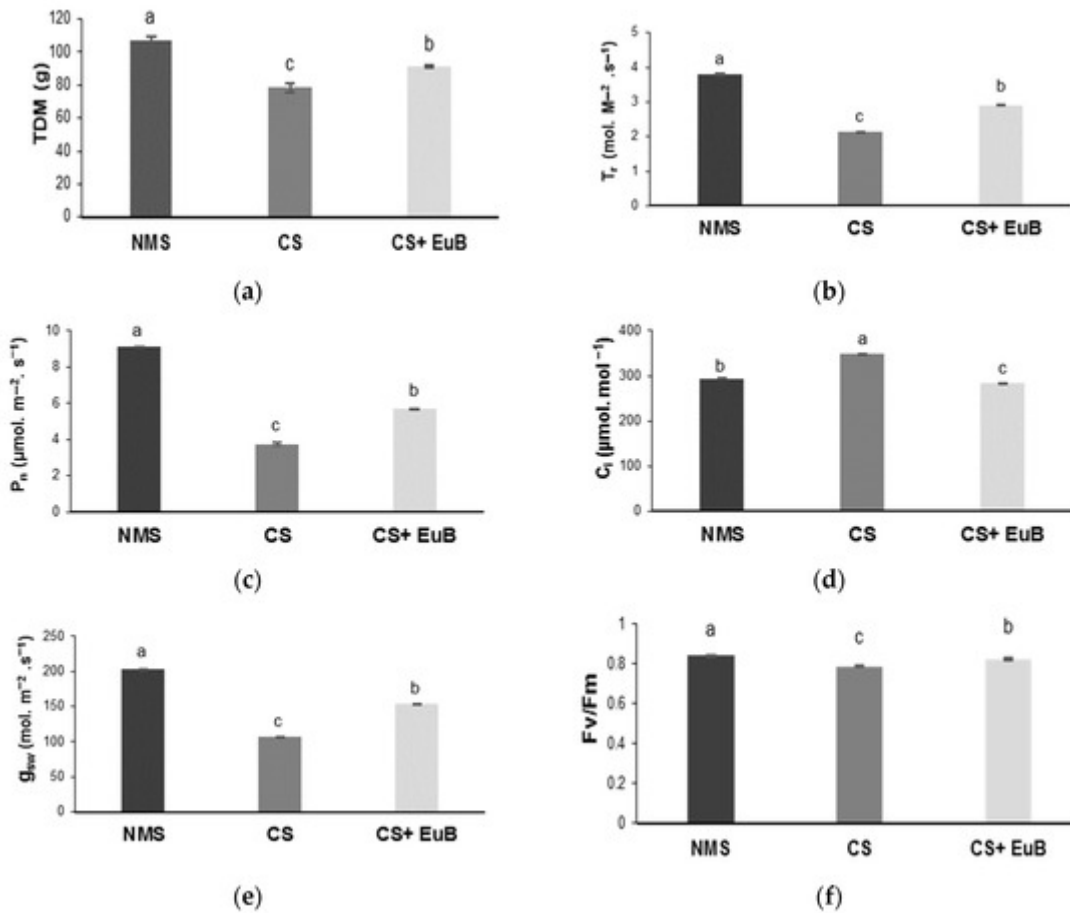


Figure 1. (a) Total dry mass (TDM); (b) transpiration rate (T_r); (c) net photosynthetic rate (P_n); (d) intercellular CO_2 concentration (C_i); (e) stomatal conductance (g_{sw}); (f) chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) in *C. glauca* after 6 months of growing in non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and contaminated soil with biochar (CS + EuB). Each value represents the mean $\pm$ standard error ($n = 5$). Means followed by different letters indicate statistical differences at $p \leq 0.05$, according to Fisher's LSD (Least Significant Difference) tests.

After six months, gas exchanges parameters were significantly affected by contaminated soil conditions. CS seedlings had significantly lower transpiration rate (44%), assimilation rate (59%), stomatal conductance (47%), and chlorophyll fluorescence (7.2%) compared to the NMS seedlings (**Figure 1b,c,e,f**), whereas, C_i significantly increased by 15% under CS compared to NMS seedlings (**Figure 1d**). The EuB mitigated CS-induced stress, resulting in less pronounced reductions in T_r (23%), P_n (37%), g_{sw} (25%), and Fv/Fm (4.3%), compared to NMS seedlings.

Seedlings grown under CS revealed a significant effect ($p < 0.05$) of the trace metals on Chl a, Chl b, Tchl and Car compared to those of NMS seedlings, reaching 58%, 73%, 63% and 60%, respectively (**Figure 2**). However, the addition of EuB significantly improved chlorophyll

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

content levels, for Chl a, Chl b, Tchl and Car reached 52%, 54%, 52%, and 53%, respectively, with respect to the CS treatment (**Figure 2**).

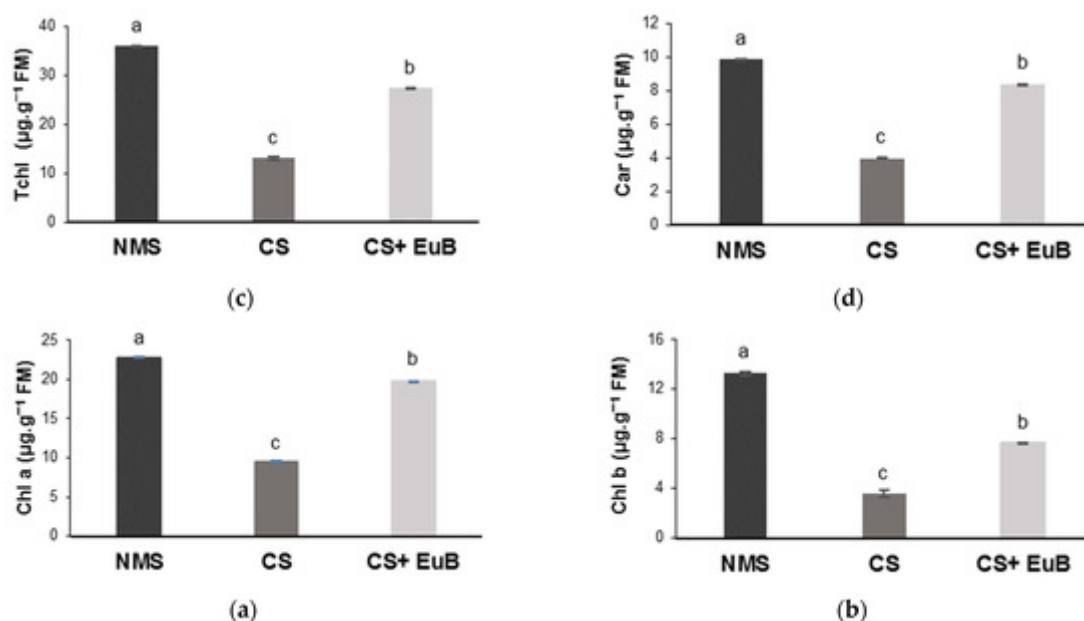


Figure 2. (a) Chlorophyll a (Chl a); (b) chlorophyll b (Chl b); (c) total chlorophyll (Tchl); (d) carotenoids (Car) content in *C. glauca* needles after 6 months of growing in non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and contaminated soil with biochar (CS + EuB). Means followed by different letters indicate statistical differences at $p \leq 0.05$, according to Fisher's LSD (Least Significant Difference) tests.

3.2. Water Status, Biochemical Compounds and Electrolyte Leakage

After six months of growth, *C. glauca* seedlings grown in CS exhibited a significant reduction in RWC compared to those in NMS ($p = 0.0026$, **Figure 3a**). The addition of *Eucalyptus* biochar mitigated the effect of TM, where RWC in CS + EuB seedlings was higher than under CS, though still lower than in NMS treatment.

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

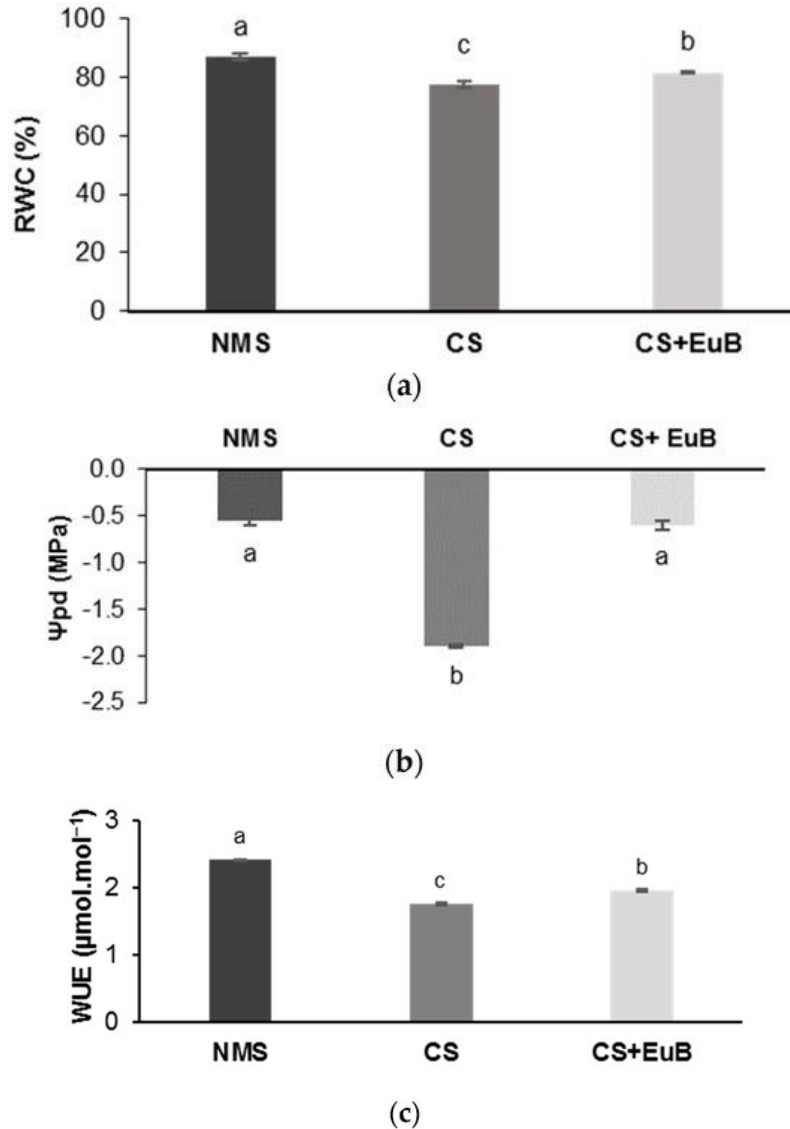


Figure 3. (a) Relative water content (RWC) (b) Predawn water potential (Ψ_{pd}); (c) Water use efficiency (WUE) of *C. glauca* after 6 months of growing in non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and contaminated soil with biochar (CS + EuB). Each value represents the mean $\pm$ standard error ($n = 5$). Means followed by different letters indicate statistical differences at $p \leq 0.05$, according to Fisher's LSD (Least Significant Difference) tests.

Predawn water potential (**Figure 3b**), reflecting intense water stress caused by trace metals. Ψ_{pd} showed a significant reduction ($p < 0.0001$) under CS treatment compared to NMS. Under contaminated conditions, Eu-biochar increased Ψ_{pd} of *C. glauca* seedlings compared to CS seedlings and similar improvements were observed relative to NMS seedlings.

Under contaminated conditions, WUE was significantly ($p < 0.0001$), reduced (**Figure 3c**). WUE values were significantly lower under the CS treatment compared to other treatments.

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

The CS + EuB treatment improved WUE relative to CS, although values remained below those observed in the NMS treatment, indicating a partial recovery.

Seedlings grown under CS exhibited a significant increase in hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration compared to those under NMS ($p < 0.0001$), reaching levels 1.8-fold higher (**Figure 4a**). However, EuB addition significantly mitigated the effects of trace metal exposure, reducing significantly H_2O_2 accumulation compared to the CS treatment (**Figure 4a**). MDA levels were significantly elevated in CS compared to non-mining soil ($p < 0.0001$). However, CS amended with EuB revealed a significant reduction in MDA by 44% relative to CS (**Figure 4c**). Contaminated soil triggered a significant ($p < 0.05$) overproduction of CAT and GPOX, compared to NMS (**Figure 4b,d**). The addition of EuB significantly reduced enzyme overproduction relative to CS. Under trace metal stress, EL increased by 3.2-fold in CS compared to non-mining soil ($p < 0.05$). But the incorporation of EuB significantly ameliorated this effect, reducing EL by 37% relative to CS (**Figure 4e**).

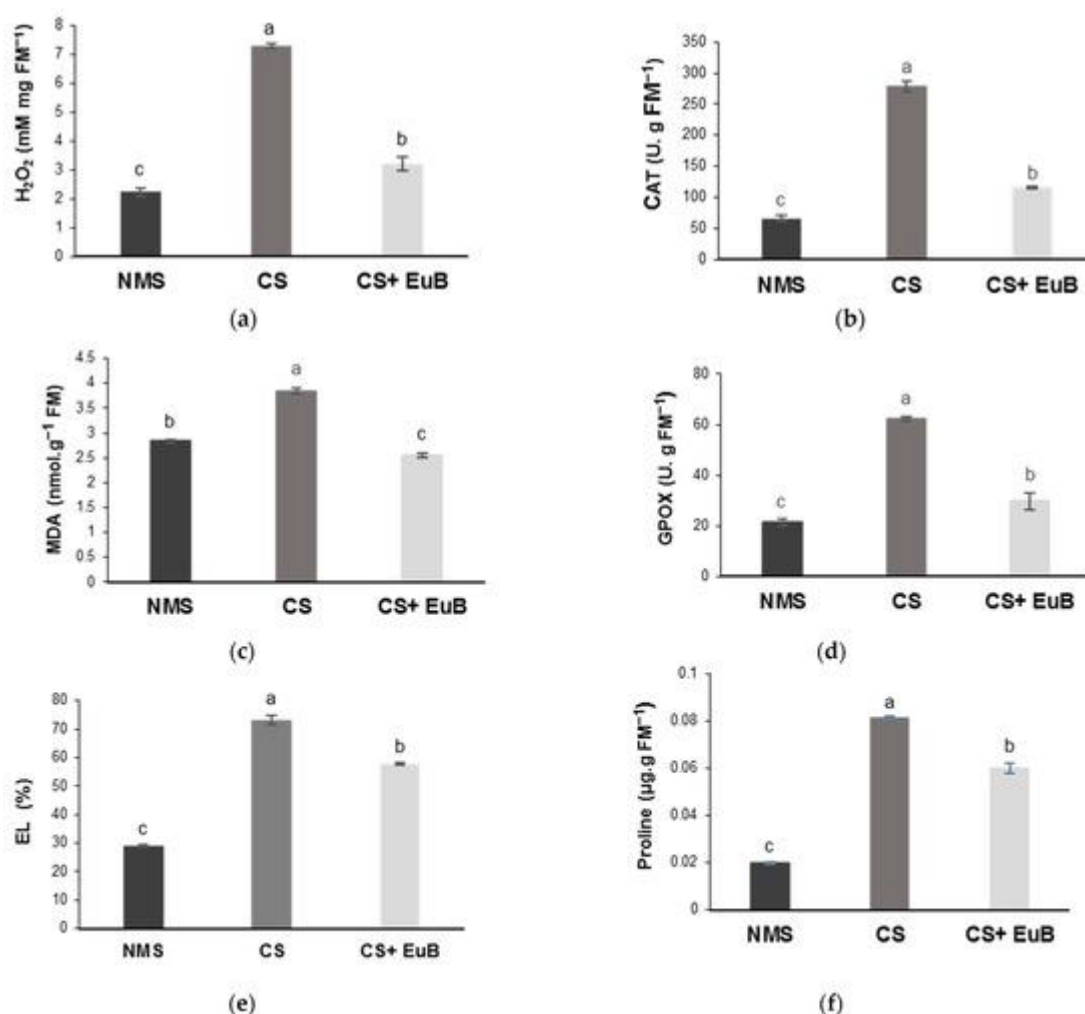


Figure 4. (a) Hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration; (b) Catalase (CAT) activity; (c) Malondialdehyde (MDA) concentration; (d) guaiacol peroxidase (GPOX) activity; (e) electrolyte leakage (EL); (f) Proline concentration in *C. glauca* after six months of growing in non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and contaminated soil with biochar (CS + EuB). Each value represents the mean $\pm$ standard error ($n = 5$). Means followed by different letters indicate statistical differences at $p \leq 0.05$, according to Fisher's LSD (Least Significant Difference) tests.

Proline accumulation induced by TM exposure surged 4-fold in CS compared to NMS (**Figure 4f**). CS + EuB significantly mitigated this response, reducing proline levels by 50% relative to CS (statistical groupings: a, b, c). This attenuation underscores biochar's capacity to restore cellular homeostasis, likely through metal immobilization, ROS neutralization, or enhanced osmoregulatory efficiency, thereby alleviating stress-driven metabolic demands in plants.

3.3. Accumulation and Phytoremediation Potentiality of Trace Metals

After 6 months of growth, under CS *C. glauca* seedlings exhibited significant accumulation of Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, and As in roots and Zn, Mn and Pb in shoots (**Figure V**). The overall accumulation pattern in *C. glauca* followed the order: Fe > Mn > Zn > Pb > As > Cd. Biochar amendment (CS + EuB) induced metal-specific responses: root Mn decreased significantly, while Cd increased sharply, with Fe, Zn, Pb, and As (**Figure V a,b,e,f**) remaining stable. Shoot metal accumulation patterns varied significantly by element (**Figure V**). Zn alone exhibited treatment-dependent variation, exceeding 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ across all conditions (**Figure Vb**). Fe, Cd, and As maintained consistently high concentrations ($>10,000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $>100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and $>1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively) without significant treatment effects (**Figure V a,d,f**). Conversely, Mn and Pb showed significantly higher accumulation in CS and CS + EuB versus NMS ($p < 0.05$; **Figure Vc,e**), with Pb $> 1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in all treatments and Mn $> 10,000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ exclusively in contaminated soils. *C. glauca* demonstrated exceptional rhizofiltration potential through dominant root retention of trace metals. EuB amendment further modulated metal partitioning by: (1) reducing Mn uptake by 18% versus CS (**Figure Vc**), (2) enhancing Cd bioavailability (reflected in 32% higher shoot accumulation; **Figure Vd**), and (3) limiting Zn translocation to shoots despite elevated root concentrations.

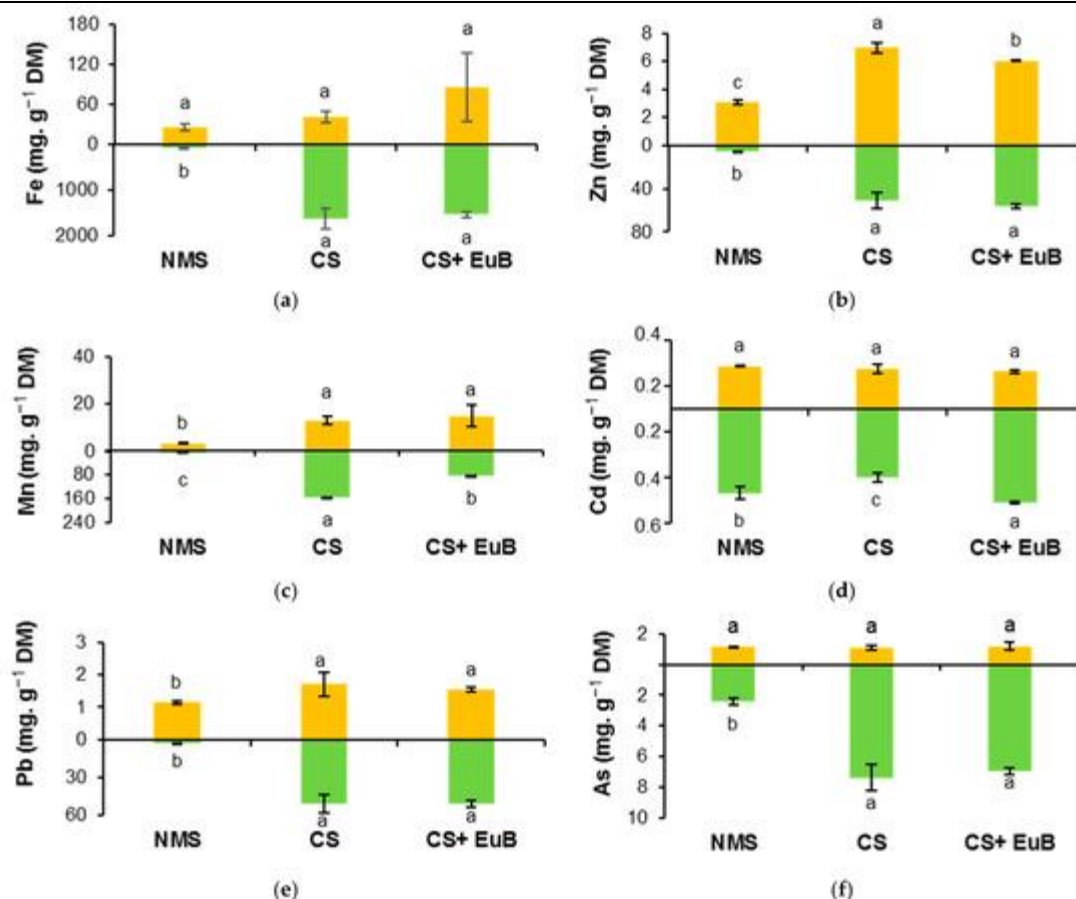


Figure V. Variation in trace metals concentrations: (a) iron (Fe); (b) zinc (Zn); (c) manganese (Mn); (d) cadmium (Cd); (e) arsenic (As); (f) lead (Pb) in shoots and roots of *C. glauca* after 6 months of growing in non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and contaminated soil with biochar (CS + EuB); orange: shoots, green: roots. Each value represents the mean $\pm$ standard error ($n = 3$). Means followed by different letters indicate statistical differences at $p \leq 0.05$, according to Fisher's LSD (Least Significant Difference) tests.

Eucalyptus biochar distinctly enhances *Frankia* nodule development (**Figure 6**). The accumulation profile within nodules revealed a clear preference for sequestration in the order $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Pb} > \text{Zn} > \text{As} > \text{Cd}$ (**Table 2**). In particular, EuB treatment significantly amplified Zn, Mn, Pb, and Cd concentrations in nodules by 1.4-, 2.4-, 1.5- and 2.0-fold, respectively, relative to nodules formed in contaminated soil. In contrast, As and Fe levels remained essentially unchanged compared to *Frankia* nodule under contaminated soil.

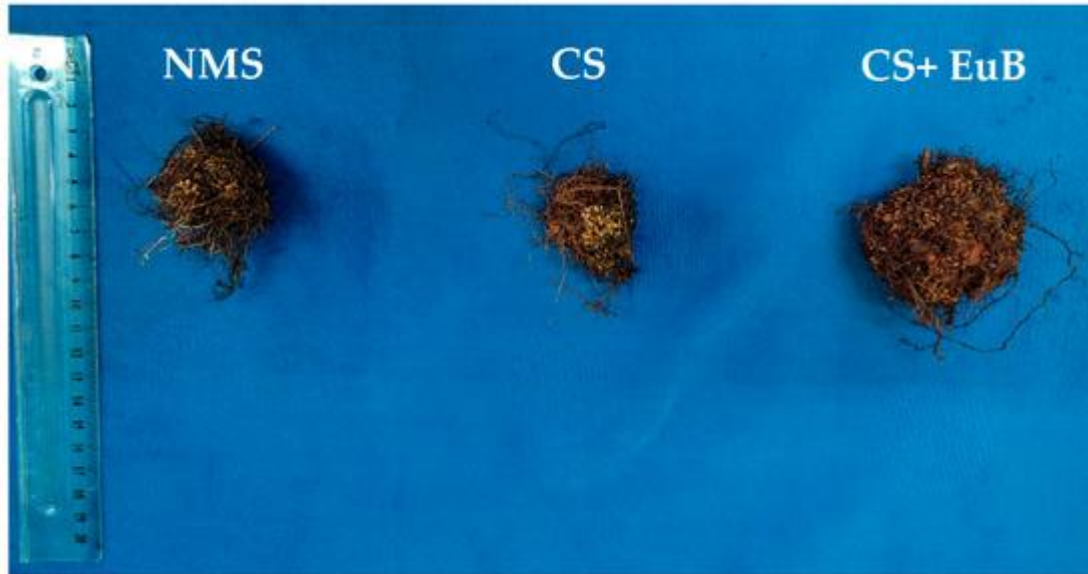


Figure 6. *Frankia* nodules in *C. glauca* roots after 6 months of growing in non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and contaminated soil with biochar (CS + EuB).

Table 2. Translocation factor (TF), bioconcentration factor (BCF), final bioavailable concentration (FBC), and concentrations in *Frankia* nodules (CFN) of trace metals after 6 months exposure to non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and contaminated soil with biochar (CS + EuB).

Treatments	Fe	Zn	Mn	Pb	Cd	As
TF						
NMS	0.328 ± 0.073 a	0.615 ± 0.010 a	0.602 ± 0.140 a	0.482 ± 0.007 a	0.506 ± 0.017 a	0.967 ± 0.046 a
CS	0.025 ± 0.002 c	0.137 ± 0.014 b	0.083 ± 0.006 c	0.034 ± 0.007 b	0.593 ± 0.046 a	0.195 ± 0.015 c
CS + EuB	0.056 ± 0.021 b	0.108 ± 0.023 b	0.177 ± 0.033 b	0.029 ± 0.001 c	0.397 ± 0.009 b	0.334 ± 0.044 b
BCF						
NMS	4.421 ± 0.552 c	0.760 ± 0.036 b	0.152 ± 0.038 c	0.259 ± 0.010 b	—	1.805 ± 0.045 c
CS	30.164 ± 2.147 b	2.339 ± 0.151 a	1.562 ± 0.130 a	0.571 ± 0.046 a	—	5.267 ± 0.201 a
CS + EuB	102.057 ± 0.574 a	0.248 ± 0.001 c	0.398 ± 0.013 b	0.555 ± 0.018 a	7.395 ± 0.150 a	4.026 ± 0.119 b
FBC (mg·kg ⁻¹)						
NMS	24.560 ± 0.672 b	10.618 ± 0.309 c	67.564 ± 0.409 c	13.677 ± 0.458 c	<QL	36.046 ± 0.330 c
CS	55.195 ± 0.918 a	24.816 ± 0.136 b	108.848 ± 0.040 b	92.603 ± 0.585 b	<QL	37.286 ± 0.032 b
CS + EuB	15.844 ± 0.053 c	249.922 ± 0.765 a	245.230 ± 1.639 a	161.233 ± 0.681 a	0.078 ± 0.001 a	37.899 ± 0.201 a
CFN (mg·g ⁻¹)						
NMS	2.759 ± 0.159 b	0.058 ± 0.007 c	0.046 ± 0.003 c	0.027 ± 0.005 c	—	0.068 ± 0.008 b
CS	116.638 ± 3.261 a	1.657 ± 0.061 b	4.898 ± 0.170 b	1.834 ± 0.047 b	0.001 ± 0.0001 b	0.530 ± 0.010 a
CS + EuB	119.498 ± 5.680 a	2.447 ± 0.123 a	12.164 ± 0.317 a	2.798 ± 0.103 a	0.002 ± 0.00009 a	0.543 ± 0.057 a

QL: quantification limit. Results are expressed as the mean value (•)SE, n = 3). Means followed by different letters indicate statistical differences at $p \leq 0.05$, according to Fisher's LSD (Least Significant Difference) tests.

Translocation factor values for all TM remained $TF < 1$ across treatments (**Table 2**). Eu-Biochar (CS + EuB) significantly modulated TF values with an increase for Fe, Mn, and for As compared to CS, underscoring biochar's metal-specific influence on root to shoot transfer. Bioconcentration factor values revealed distinct TM sequestration patterns in roots (**Table 2**).

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

Under contaminated soil conditions, the Fe BCF exceeded 10 in both CS and CS + EuB treatments. Biochar-amended treatment exhibits a 3.4-fold increase in Fe uptake relative to CS. While Zn, Mn, and As all showed significant accumulation in CS ($BCF > 1$), their uptake was significantly lowered by EuB amendment. In contrast, Cd accumulation only reached quantifiable levels in the CS + EuB treatment ($BCF > 1$), indicating that biochar enhanced Cd sequestration by *C. glauca* seedlings. Pb remained below threshold levels in all treatments ($BCF < 1$), confirming that its immobilization was unaffected by the addition of EuB.

Final bioavailable concentration (FBC) revealed profound treatment-specific shifts in trace metal solubility (**Table 2**). CS + EuB treatment induced hyper-solubility for Zn, Mn, and Pb. Conversely, Fe bioavailability reduced by 71% in CS + EuB compared to CS treatment. These opposing trends underscore biochar's metal-specific solubilization effects: dramatically enhancing Zn/Mn/Pb mobility while immobilizing Fe.

Principal component analysis (PCA) revealed distinct patterns linking soil TM bioavailability and *C. glauca* physiological responses across treatments NMS, CS and CS + EuB (**Figure 7**). The first principal component (PC1), which explained 81% of the total variance, showed a strong association between the bioavailable concentrations of Fe, Zn, Mn, Cd, Pb, and As in soil and key stress indicators such as Pro, EL, MDA, H_2O_2 , antioxidant enzyme activities, Ci, and the accumulation of Mn, Pb, As, Fe, and Zn in roots and shoots. Conversely, PC1 was negatively correlated with Ψ_{pd}

photosynthetic pigments, photosynthetic efficiency, gas exchange parameters, TDM, RWC, and WUE. The second component (PC2), accounting for the remaining 19% of the variance, primarily distinguished tissue-specific accumulation patterns of Cd, Fe and As between shoots and roots.

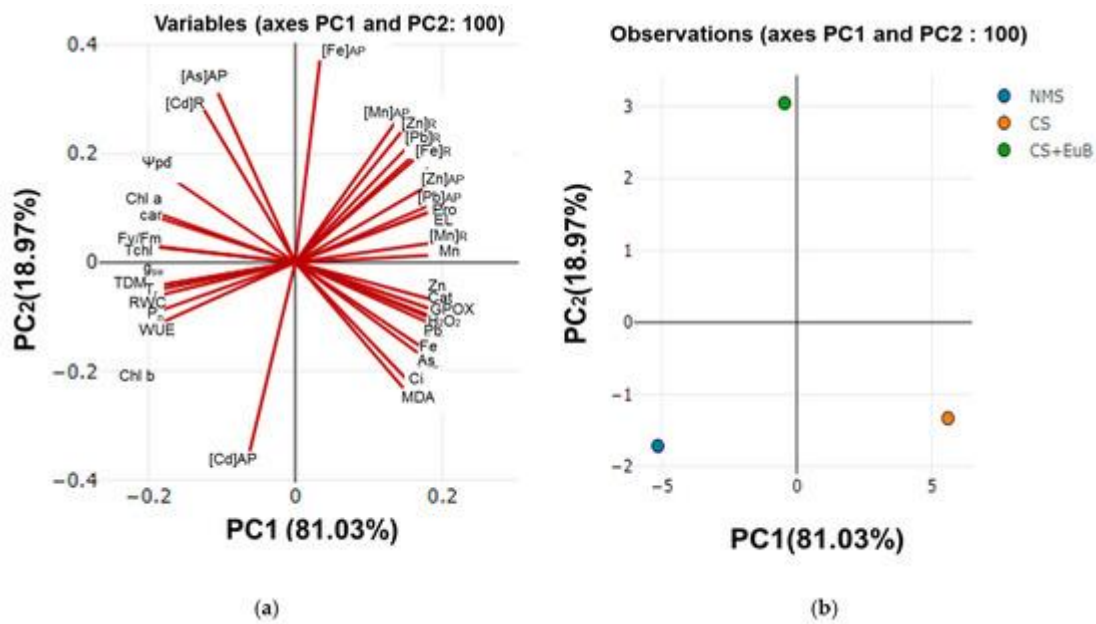


Figure 7. Principal component analysis (PCA): (a) variable factor map; (b) distribution of treatments in the PC1 × PC2 factorial plane: non-mining soil (NMS), contaminated soil (CS), and contaminated soil with biochar (CS + EuB), Iron (Fe), Zinc (Zn), Lead (Pb), Manganese (Mn), Cadmium (Cd), Arsenic (As), Total dry mass (TDM), chlorophyll fluorescence (Fv/Fm), net photosynthetic rate (P_n), transpiration rate (T_r), stomatal conductance (g_{sw}), intercellular CO_2 concentration (C_i), Electrolyte Leakage (EL), Chlorophyll a (chl a), chlorophyll b (chl b), total chlorophyll (Tchl), carotenoids (car) content, predawn water potential (Ψ_{pd}), Water use efficiency (WUE), Relative water content (RWC), proline (Pro), malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration, catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPOX) activities, R: roots, and AP: shoots.

Collectively, these results demonstrate that elevated TM bioavailability in soil induces pronounced physiological stress—marked by oxidative damage, activation of antioxidant defenses and severe impairment of photosynthesis, water relations and growth. The contaminated soil clustered distinctly from the non-contaminated soil, whereas the CS + EuB treatment occupied an intermediate position, indicating that biochar amendment substantially mitigates trace-metal-induced stress.

4. Discussion

This study investigates soil contamination in mining areas and evaluates the potential of *Eucalyptus*-derived biochar (EuB) to mitigate TM stress (Fe, Zn, Pb, Mn, Cd, As) in *C. glauca* seedlings by reducing metal bioavailability in soil.

Contaminated soils significantly impair photosynthesis activity (**Figure 1c**), as evidenced by reduced chlorophyll content (**Figure 2c**), consistent with known mechanisms of chlorophyll degradation under metal stress [72]. A decrease in Chl a and Chl b can impair Rubisco activity which in turn decreases the amount of CO_2 fixation [73]. The Fv/Fm decrease (**Figure 1f**)

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

further indicates photosystem II instability [74]. A higher intercellular CO₂ concentration (**Figure 1d**) suggest compromised CO₂ utilization, potentially reducing photosynthetic efficiency via feedback inhibition [52] and limiting the accumulation of organic matter [75], ultimately hindering seedling growth under contaminated soil (**Figure 1a**). However, EuB addition significantly improved photosynthetic performance in contaminated soils (**Figure 1b**), as evidenced by increases in chlorophyll content and F_v/F_m efficiency. These improvements are likely due to biochar's ability to restore soil moisture [14,76] and to enhance nutrient availability and soil fertility under severe pollution conditions [14,77]. Thus, EuB had positive effects on *C. glauca* seedling growth (**Figure 1a**) by increasing mineral nutrients availability in the soil and stimulating production of photosynthetic pigments [43,78].

Under contaminated conditions, *C. glauca* showed signs of water stress, indicated by decreased RWC (**Figure 3a**), Ψ_{pd} (**Figure 3b**) and WUE (**Figure 3c**) likely mediated by abscisic acid (ABA) accumulation [79]. This triggered stomatal closure, reducing transpiration rates (**Figure 1e**) and impairing water transport to needles. High concentrations of TM, result in increased osmotic stress [52,80], limiting root water uptake and imposing induced drought stress [81] as confirmed by lowered Ψ_{pd} under CS conditions (**Figure 3b**) which leads to a decrease in g_{sw} (**Figure 1e**) as indicators of water stress and leads to reduced gas exchange (P_n and T_r). Biochar application under contaminated conditions (CS + EuB) improved stomatal conductance (**Figure 1e**), alleviated water stress in *C. glauca* by stabilizing Ψ_{pd} (**Figure 3b**), and restored RWC and WUE (**Figure 3a,c**) through enhanced soil water retention [35]. In contaminated soils, WUE thus emerges as a useful bioindicator for assessing plant resilience under osmotic-induced drought. Additionally, trace metals induced oxidative stress, evidenced by elevated H₂O₂, lipid peroxidation (increased MDA) and electrolyte leakage (**Figure 4a,c,e**) [52,82].

In fact, a strong association between Pro, H₂O₂, CAT, and GPOX, confirming coordinated stress responses (**Figure 7**). The antioxidant defense system involves CAT and GPOX and Pro accumulation were significantly higher in CS seedlings (**Figure 4b,d,f**). These enzymatic antioxidants help plants to cope with H₂O₂-induced cellular damage [52,83] to protect cell membranes. In contaminated soils, biochar amendment significantly alleviated toxicity, expressed by reduced H₂O₂ accumulation and MDA content, thereby decreasing electrolyte leakage and improving membrane stability (**Figure 4c,e**). Biochar also lessened CAT, GPOX,

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

and Pro overproduction, indicating lower oxidative stress intensity (**Figure 4b,d,f**). Plants combat oxidative stress using multi-enzymatic defense system [19]. ACP further associated reduced electrolyte leakage with biochar's mitigation of soil TM bioavailability and plant uptake (**Figure 7**), demonstrating its role in enhancing stress resilience.

Trace metals (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd, and As) accumulation was significantly ($p < 0.05$) higher in roots than shoots ($TF < 1$) highlighting roots as primary sinks for trace metals (**Figure V, Table 2**). Notably, the higher Cd concentration in roots under NMS may be due to its lower specific surface area ($1 \pm 0.057 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, **Table 1**), which offers fewer adsorption sites for Cd, thereby increasing its mobility and bioavailability for plant uptake [84]. Under CS + EuB treatment Cd concentrations in roots increased, while Mn decreased (**Figure Vc,d**), suggesting competitive inhibition, phenomenon corroborated by biochar-induced Mn mobility shifts via reductive dissolution of Mn^{4+} to Mn^{2+} as suggested by Graber et al. [85] and Lu et al. [86]. *Eucalyptus* biochar amendment also enhanced translocation of As, Mn, and Fe (**Table 2**), attributable to pH-mediated speciation of As (III) to As (V) [87] and stimulation of siderophore producing bacteria facilitating Fe^{3+} solubilization [88]. In contrast, Cd and Pb translocation diminished, due to biochar's inhibition of symplastic xylem transport and subsequent nodular sequestration [89], supporting a phytostabilization mechanism, wherein trace metals are immobilized in non-translocatable tissues [90]. Significantly, shoot metal concentrations remained stable except for Zn ($p < 0.05$), underscoring biochar's role in restricting upward mobility while modulating root-zone metal dynamics.

Biochar significantly enhanced overall TM bioavailability (excluding Fe; **Table 2**), likely through ion exchange processes where soil metals displaced surface ions on biochar [91]. Elevated TM concentrations in *Frankia* nodules (**Table 2**) confirmed their role as transient sinks, aligning with this mechanism. Bioconcentration factor analysis revealed significant root accumulation of Fe in *C. glauca* under the CS + EuB treatment ($BCF > 100$; $TF < 1$), alongside moderate Cd uptake. This pattern is attributed to Fe sequestration within *Frankia* root nodules and concomitant inhibition of translocation to shoots. Furthermore, *Eucalyptus* biochar amendment reduced As accumulation while suppressing BCF values for Mn and Zn ($BCF < 1$; $TF < 1$), indicating selective immobilization of these metals. Notably, *C. glauca* exhibited a high capacity for hyperaccumulating Fe, Zn, As, Pb, and Cd in shoots across all treatments (**Figure Va,b,d-f**) with concentrations substantially exceeding established hyperaccumulation

thresholds (Zn > 3000 µg/g, As > 1000 µg/g, Pb > 1000 µg/g, and Cd > 100 µg/g [92,93]. The highest concentrations were observed for Fe, reaching 85,760 µg/g in CS + EuB treatment (**Figure Va**). These findings underscore the significant promise of the *C. glauca*–*Frankia* symbiosis combined with *Eucalyptus* biochar as a targeted strategy for rehabilitating contaminated mine soils, and provide a foundation for optimizing this synergistic phytotechnology.

5. Conclusions

This study has demonstrated that, under contaminated soils, the application of *Eucalyptus*-derived biochar simultaneously alleviates physiological stress in *C. glauca* seedlings leading to notable improvements in biomass (+14%), photosynthesis efficiency (+37%), and WUE, while simultaneously suppressing oxidative damage. *C. glauca* showed strong hyperaccumulation of Fe, Zn, As, Pb, and Cd in all treatments, with a particularity for Fe under CS + EuB.

Eucalyptus biochar transforms *C. glauca*'s root-*Frankia* nodule system as a dynamic metal sink, characterized by Fe accumulation (BCF > 100) -driven by nitrogenase activity, significant Fe immobilization in soil (−71% bioavailability), and amplifying sequestration of Cd (2.0×), Mn (2.4×), and Pb (1.5×) within nodules. ACP analysis confirms that EuB decouples ion trace metal bioavailability from physiological toxicity, guiding plants toward an intermediate state of resilience.

This integrated response—combining trace metals immobilization (Fe, As and Pb), stress mitigation, and symbiotic bioaccumulation (Cd, Mn and Zn)—positions the EuB-*C. glauca* system as a promising, scalable model for sustainable rehabilitation of degraded lands. By transforming forestry waste into a valuable resource for ecological restoration, this approach aligns circular bioeconomy goals while addressing critical soil security challenges.

This study demonstrates the remediation potential of *Eucalyptus*-derived biochar under controlled conditions. Critical limitations regarding long-term stability, cost-effectiveness, and field scalability must be resolved prior to practical deployment. To address these constraints, a field trial was initiated in March 2025 at a contaminated mine site, directly evaluating long-term efficacy, operational feasibility, and real-world performance.

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

References

1. FAO. Statistical Yearbook 2024 Reveals Critical Insights on the Sustainability of Global Agriculture, Food Security, and the Importance of Agrifood Systems in Employment. Available online: <https://www.fao.org/newsroom/detail/fao-statistical-yearbook-2024-reveals-critical-insights-on-the-sustainability-of-agriculture-food-security-and-the-importance-of-agrifood-in-employment/en> (accessed on 24 May 2025).
2. Rai, P.K.; Sonne, C.; Kim, K.-H. Heavy Metals and Arsenic Stress in Food Crops: Elucidating Antioxidative Defense Mechanisms in Hyperaccumulators for Food Security, Agricultural Sustainability, and Human Health. *Sci. Total Environ.* **2023**, *874*, 162327. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
3. Focus, E.; Rwiza, M.J.; Mohammed, N.K.; Banzi, F.P. Health Risk Assessment of Trace Elements in Soil for People Living and Working in a Mining Area. *J. Environ. Public Health* **2021**, *2021*, 9976048. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
4. Rashid, A.; Schutte, B.J.; Ulery, A.; Deyholos, M.K.; Sanogo, S.; Lehnhoff, E.A.; Beck, L. Heavy Metal Contamination in Agricultural Soil: Environmental Pollutants Affecting Crop Health. *Agronomy* **2023**, *13*, 1521. [Google Scholar] [CrossRef]
5. Mesele, S.A.; Mechri, M.; Okon, M.A.; Isimikalu, T.O.; Wassif, O.M.; Asamoah, E.; Ahmad, H.A.; Moepi, P.I.; Gabasawa, A.I.; Bello, S.K.; et al. Current Problems Leading to Soil Degradation in Africa: Raising Awareness and Finding Potential Solutions. *Eur. J. Soil Sci.* **2025**, *76*, e70069. [Google Scholar] [CrossRef]
6. Ghouma, A.; Aydi, A.; Martin, J.A.R.; Gasmi, M. Health Risk Assessment Associated to Heavy Metal Pollution Levels in Mediterranean Environment Soils: A Case Study in the Watershed of Sebket Ariana, Tunisia. *Arab. J. Geosci.* **2022**, *15*, 716. [Google Scholar] [CrossRef]
7. Salhi, R.; Durães, N.; Dhaoui, M.; Patinha, C.; Ferreira da Silva, E.; Mlayah, A. Contamination Assessment and Availability of Potential Toxic Elements from the Sidi Driss Tailing Pile (NW Tunisia) Based on Geochemical and Geophysical Methods. *J. Afr. Earth Sci.* **2023**, *202*, 104921. [Google Scholar] [CrossRef]
8. Ayari, J.; Barbieri, M.; Barhoumi, A.; Boschetti, T.; Braham, A.; Dhaha, F.; Charef, A. Trace Metal Element Pollution in Media from the Abandoned Pb and Zn Mine of Lakhout, Northern Tunisia. *J. Geochem. Explor.* **2023**, *247*, 107180. [Google Scholar] [CrossRef]
9. Xia, F.; Zhao, Z.; Niu, X.; Wang, Z. Integrated Pollution Analysis, Pollution Area Identification and Source Apportionment of Heavy Metal Contamination in Agricultural Soil. *J. Hazard. Mater.* **2024**, *465*, 133215. [Google Scholar] [CrossRef]
10. Nouairi, J.; Baraud, F.; Leleyter, L.; Mefteh, S.; Rocha, F.; Medhioub, M. Spatial Distribution and Ecological Risk Assessment of Potentially Toxic Elements in Agricultural Soils, Stream Sediments, and Plants around Lakhout Mine (Northwestern Tunisia). *Arab. J. Geosci.* **2021**, *14*, 130. [Google Scholar] [CrossRef]
11. Mabrouk, L.; Mabrouk, W.; Mansour, H.B. High Leaf Fluctuating Asymmetry in Two Native Plants Growing in Heavy Metal-Contaminated Soil: The Case of Metlaoui Phosphate Mining Basin (Gafsa, Tunisia). *Environ. Monit. Assess.* **2020**, *192*, 406. [Google Scholar] [CrossRef]
12. Achour, Y.; Souissi, R.; Tlil, H.; Heino, M.M.; Souissi, F. Heavy Metals (Pb, Zn, Cd) and Metalloids (Sb, As) in Carbonated Soils Contaminated by Mine Tailings (North Tunisia). In *New Prospects in Environmental Geosciences and Hydrogeosciences*; Chenchouni, H., Chaminé, H.I., Khan, M.F., Merkel, B.J., Zhang, Z., Li, P., Kallel, A., Khélifi, N., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022; pp. 227–230. [Google Scholar]
13. Álvarez-Rogel, J.; Peñalver-Alcalá, A.; González-Alcaraz, M.N. Spontaneous Vegetation Colonizing Abandoned Metal(Loid) Mine Tailings Consistently Modulates Climatic, Chemical and Biological Soil Conditions Throughout Seasons. *Sci. Total Environ.* **2022**, *838*, 155945. [Google Scholar] [CrossRef]
14. Lohar, S.; Kumari, P.; Sharma, A.; Godara, V.; Nagar, V.; Prajapati, M.; Singhal, A.; Sharma, V.; Verma, R.; Singh Sankhla, M. Biochar Enhancing Soil Resilience: A Dual Strategy for Mitigating Heavy Metal Contamination and Drought Stress. *Lett. Appl. NanoBioScience* **2024**, *13*, 70. [Google Scholar] [CrossRef]
15. Islam, M.; Sandhi, A. Heavy Metal and Drought Stress in Plants: The Role of Microbes—A Review. *Gesunde Pflanz.* **2023**, *75*, 695–708. [Google Scholar] [CrossRef]
16. Qiao, P.; Wang, S.; Li, J.; Zhao, Q.; Wei, Y.; Lei, M.; Yang, J.; Zhang, Z. Process, Influencing Factors, and Simulation of the Lateral Transport of Heavy Metals in Surface Runoff in a Mining Area Driven by Rainfall: A Review. *Sci. Total Environ.* **2023**, *857*, 159119. [Google Scholar] [CrossRef]
17. Machairas, E.; Varouchakis, E.A. Cost–Benefit Analysis and Risk Assessment for Mining Activities in Terms of Circular Economy and Their Environmental Impact. *Geosciences* **2023**, *13*, 318. [Google Scholar] [CrossRef]

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

18. Mestanza-Ramón, C.; Cuenca-Cumbicus, J.; D'Orio, G.; Flores-Toala, J.; Segovia-Cáceres, S.; Bonilla-Bonilla, A.; Straface, S. Gold Mining in the Amazon Region of Ecuador: History and a Review of its Socio-Environmental Impacts. *Land* **2022**, *11*, 221. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Hachani, C.; Lamhamedi, M.S.; Abassi, M.; Sleimi, N.; Béjaoui, Z. Effects of Heavy Metal-Polluted Soil (Pb, Zn, and Cd) on Seed Emergence, Seedling Growth, and Antioxidant Activity in Four *Fabaceae* Species. *Water, Air, Soil Pollut.* **2022**, *233*, 263. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Rao, M.J.; Zheng, B. The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Tolerance and Their Antioxidant Properties to Scavenge Reactive Oxygen Species and Free Radicals. *Antioxidants* **2025**, *14*, 74. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Farooq, T.H.; Rafay, M.; Basit, H.; Shakoar, A.; Shabbir, R.; Riaz, M.U.; Ali, B.; Kumar, U.; Qureshi, K.A.; Jaremko, M. Morpho-Physiological Growth Performance and Phytoremediation Capabilities of Selected Xerophyte Grass Species Toward Cr and Pb Stress. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 997120. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Kour, J.; Kohli, S.K.; Khanna, K.; Bakshi, P.; Sharma, P.; Singh, A.D.; Ibrahim, M.; Devi, K.; Sharma, N.; Ohri, P.; et al. Brassinosteroid Signaling, Crosstalk and, Physiological Functions in Plants Under Heavy Metal Stress. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 608061. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Rajput, V.D.; Harish; Singh, R.K.; Verma, K.K.; Sharma, L.; Quiroz-Figueroa, F.R.; Meena, M.; Gour, V.S.; Minkina, T.; Sushkova, S.; et al. Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology* **2021**, *10*, 267. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Zulfiqar, F.; Ashraf, M. Proline Alleviates Abiotic Stress Induced Oxidative Stress in Plants. *J. Plant Growth Regul.* **2023**, *42*, 4629–4651. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Gregory, P.J. RUSSELL REVIEW are Plant Roots Only “in” Soil or Are They “of” it? Roots, Soil Formation and Function. *Eur. J. Soil Sci.* **2022**, *73*, e13219. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
26. Maity, P.J.; Pawlowski, K. Anthropogenic Influences on the Distribution of the Casuarina-Frankia Symbiosis. *Symbiosis* **2021**, *84*, 353–367. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
27. Ghazouani, S.; Béjaoui, Z.; Michael, P.; Spiers, G.; Beckett, P.; Gtari, M.; Nkongolo, K. Rhizobioaugmentation of *Casuarina glauca* with N-Fixing Actinobacteria Frankia Decreases Enzymatic Activities in Wastewater Irrigated Soil: Effects of Frankia on *C. glauca* Growth. *Ecotoxicology* **2020**, *29*, 417–428. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Laamari, I.; Marques, I.; Ribeiro-Barros, A.I.; Béjaoui, Z.; Abassi, M. Can Saline Preconditioning Enhance Plant Survival in Degraded Soils? Physiological, Biochemical, and Molecular Responses in *Casuarina glauca* Saplings. *Plant Ecol.* **2023**, *224*, 905–919. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Slaïmi, R.; Abassi, M.; Béjaoui, Z. Assessment of *Casuarina glauca* as Biofiltration Model of Secondary Treated Urban Wastewater: Effect on Growth Performances and Heavy Metals Tolerance. *Environ. Monit. Assess.* **2021**, *193*, 653. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Jorge, T.F.; Ramalho, J.C.; Alseekh, S.; Pais, I.P.; Leitão, A.E.; Rodrigues, A.P.; Scotti-Campos, P.; Ribeiro-Barros, A.I.; Fernie, A.R.; António, C. Will *Casuarina glauca* Stress Resilience Be Maintained in the Face of Climate Change? *Metabolites* **2021**, *11*, 593. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Fernandes, I.; Paulo, O.S.; Marques, I.; Sarjkar, I.; Sen, A.; Graça, I.; Pawlowski, K.; Ramalho, J.C.; Ribeiro-Barros, A.I. Salt Stress Tolerance in *Casuarina glauca*: Insights from the Branchlets Transcriptome. *Plants* **2022**, *11*, 2942. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Mansoor, S.; Kour, N.; Manhas, S.; Zahid, S.; Wani, O.A.; Sharma, V.; Wijaya, L.; Alyemeni, M.N.; Alsahli, A.A.; El-Serehy, H.A.; et al. Biochar as a Tool for Effective Management of Drought and Heavy Metal Toxicity. *Chemosphere* **2021**, *271*, 129458. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Kumar, A.; Bhattacharya, T.; Shaikh, W.A.; Roy, A. Sustainable Soil Management under Drought Stress Through Biochar Application: Immobilizing Arsenic, Ameliorating Soil Quality, and Augmenting Plant Growth. *Environ. Res.* **2024**, *259*, 119531. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Li, L.; Zhang, Y.-J.; Novak, A.; Yang, Y.; Wang, J. Role of Biochar in Improving Sandy Soil Water Retention and Resilience to Drought. *Water* **2021**, *13*, 407. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. Ali, A.B.; Elshaikh, N.A. Review: Performance of Biochar under Diminish Water Stress in Plants. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2022**, *53*, 1–16. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Guo, H.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Lu, H. Effects of Biochar on Plant Growth and Hydro-Chemical Properties of Recycled Concrete Aggregate. *Sci. Total Environ.* **2023**, *882*, 163557. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

37. Ali, A.; Jabeen, N.; Chachar, Z.; Chachar, S.; Ahmed, S.; Ahmed, N.; Laghari, A.A.; Sahito, Z.A.; Farruhbek, R.; Yang, Z. The Role of Biochar in Enhancing Soil Health & Interactions with Rhizosphere Properties and Enzyme Activities in Organic Fertilizer Substitution. *Front. Plant Sci.* **2025**, *16*, 1595208. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Karimi, A.; Moezzi, A.; Chorom, M.; Enayatizamir, N. Application of Biochar Changed the Status of Nutrients and Biological Activity in a Calcareous Soil. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2020**, *20*, 450–459. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Yuan, C.; Gao, B.; Peng, Y.; Gao, X.; Fan, B.; Chen, Q. A Meta-Analysis of Heavy Metal Bioavailability Response to Biochar Aging: Importance of Soil and Biochar Properties. *Sci. Total Environ.* **2021**, *756*, 144058. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Conte, P.; Librici, C.; Nicosia, A.; Palmeri, V.; Pampalone, V.; Ferro, V. Wood-Biochar Influence on Rill Erosion Processes and Hydrological Connectivity in Amended Soils. *Hydrol. Process.* **2025**, *39*, e70093. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Huang, X.; Cai, W.; Bordoloi, S. Measurement and Prediction of Gas Permeability Function for Biochar-Amended Rooted Soils. *Geoderma* **2024**, *445*, 116882. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Ceriani, A.; Dalle Fratte, M.; Agosto, G.; Beatrice, P.; Reguzzoni, M.; Bettucci, L.; Casini, D.; Cerabolini, B.E.L.; Montagnoli, A. Woody and Herbaceous Invasive Alien Plant Species-derived Biochars Are Potentially Optimal for Soil Amendment, Soil Remediation, and Carbon Storage. *GCB Bioenergy* **2024**, *16*, e13117. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
43. Chandra, S.; Medha, I.; Bhattacharya, J.; Vanapalli, K.R.; Samal, B. Effect of the Co-Application of *Eucalyptus* Wood Biochar and Chemical Fertilizer for the Remediation of Multimetal (Cr, Zn, Ni, and Co) Contaminated Soil. *Sustainability* **2022**, *14*, 7266. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. Shafiq, M.; Alazba, A.A.; Amin, M.T. Kinetic and Isotherm Studies of Ni²⁺ and Pb²⁺ Adsorption from Synthetic Wastewater Using *Eucalyptus camdulensis*—Derived Biochar. *Sustainability* **2021**, *13*, 3785. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
45. Muhiwa, A.B.; Fonteh, M.F.; Njoyim, E.B.T.; Gapgue, F.N. Physicochemical Characterization of Biochars from *Eucalyptus maiden* *Entandrophragma cylindricum* (Liboyo), *Milicia excelsa* (Muvula.) and *Ocotea michelsonie* (Licheche) Used in Goma City, DR Congo for Water Treatment Potentials. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* **2021**, *13*, 15–24. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. Kalina, M.; Sovova, S.; Hajzler, J.; Kubikova, L.; Trudicova, M.; Smilek, J.; Enev, V. Biochar Texture—A Parameter Influencing Physicochemical Properties, Morphology, and Agronomical Potential. *Agronomy* **2022**, *12*, 1768. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Butphu, S.; Rasche, F.; Cadisch, G.; Kaewpradit, W. *Eucalyptus* Biochar Application Enhances Ca Uptake of Upland Rice, Soil Available P, Exchangeable K, Yield, and N Use Efficiency of Sugarcane in a Crop Rotation System. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2020**, *183*, 58–68. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Ullah, A.; Ren, W.-L.; Tian, P.; Yu, X.-Z. Biochar as a Green Strategy in Alleviating Cd Mobility in Soil and Uptake in Plants: A Step towards Cd-Free Food. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2024**, *190*, 105787. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Trifi, M.; Dermech, M.; Abdelkrim, C.; Azouzi, R.; Hjiri, B. Extraction Procedures of Toxic and Mobile Heavy Metal Fraction from Complex Mineralogical Tailings Affected by Acid Mine Drainage. *Arab. J. Geosci.* **2018**, *11*, 328. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. Singh, B.; Singh, B.P.; Cowie, A.L. Characterisation and Evaluation of Biochars for Their Application as a Soil Amendment. *Soil Res.* **2010**, *48*, 516–525. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Béjaoui, Z. Tolérance de Divers Clones de Peuplier à L'hydromorphie: Aspects Morphologiques, Écophysiologiques et Métaboliques. Ph.D. Thesis, University of Carthage, Tunis, Tunisia, 2006. [[Google Scholar](#)]
52. Hachani, C.; Lamhamedi, M.S.; Zine El Abidine, A.; Abassi, M.; Khasa, D.P.; Béjaoui, Z. Water Relations, Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Electrolyte Leakage of Ectomycorrhizal *Pinus halepensis* Seedlings in Response to Multi-Heavy Metal Stresses (Pb, Zn, Cd). *Microorganisms* **2021**, *10*, 57. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
53. de Santana, T.A.; Oliveira, P.S.; Silva, L.D.; Laviola, B.G.; de Almeida, A.-A.F.; Gomes, F.P. Water Use Efficiency and Consumption in Different Brazilian Genotypes of *Jatropha curcas* L. Subjected to Soil Water Deficit. *Biomass Bioenergy* **2015**, *75*, 119–125. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
54. Denden, M.; Bettaieb, T.; Salhi, A.; Mathlouthi, M. Effet de la salinité sur la fluorescence chlorophyllienne, la teneur en proline et la production florale de trois espèces ornementales. *Tropicultura* **2005**, *23*, 220–225. [[Google Scholar](#)]

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

55. Portillo-Estrada, M.; Copolovici, L.; Niinemets, Ü. Bias in Leaf Dry Mass Estimation After Oven-Drying Isoprenoid-Storing Leaves. *Trees* **2015**, *29*, 1805–1816. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
56. Lichtenthaler, H.K. [34] Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In *Methods in Enzymology*; Plant Cell Membranes; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1987; Volume 148, pp. 350–382. [[Google Scholar](#)]
57. Shabala, S.N.; Shabala, S.I.; Martynenko, A.I.; Babourina, O.; Newman, I.A. Salinity Effect on Bioelectric Activity, Growth, Na⁺ Accumulation and Chlorophyll Fluorescence of Maize Leaves: A Comparative Survey and Prospects for Screening. *Funct. Plant Biol.* **1998**, *25*, 609–616. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
58. Loutfy, N.; El-Tayeb, M.A.; Hassanen, A.M.; Moustafa, M.F.M.; Sakuma, Y.; Inouhe, M. Changes in the Water Status and Osmotic Solute Contents in Response to Drought and Salicylic Acid Treatments in Four Different Cultivars of Wheat (*Triticum aestivum*). *J. Plant Res.* **2012**, *125*, 173–184. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Barrs, H.D.; Weatherley, P.E. A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* **1962**, *15*, 413–428. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
60. Singh, N.; Ma, L.Q.; Srivastava, M.; Rathinasabapathi, B. Metabolic Adaptations to Arsenic-Induced Oxidative Stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci.* **2006**, *170*, 274–282. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
61. Hodges, D.M.; DeLong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. Improving the Thiobarbituric Acid-Reactive-Substances Assay for Estimating Lipid Peroxidation in Plant Tissues Containing Anthocyanin and Other Interfering Compounds. *Planta* **1999**, *207*, 604–611. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
62. Heath, R.L.; Packer, L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *125*, 189–198. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
63. Aebi, H. [13] Catalase In Vitro. In *Methods in Enzymology*; Oxygen Radicals in Biological Systems; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1984; Volume 105, pp. 121–126. [[Google Scholar](#)]
64. Anderson, J.M.; Chow, W.S.; Park, Y.-I. The Grand Design of Photosynthesis: Acclimation of the Photosynthetic Apparatus to Environmental Cues. *Photosynth. Res.* **1995**, *46*, 129–139. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
65. Mika, A.; Lühje, S. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1489–1498. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
66. Monneveux, P.; Nemmar, M. Contribution à l'étude de La Résistance à La Sécheresse Chez Le Blé Tendre (*Triticum aestivum* L.) et Chez Le Blé Dur (*Triticum durum* Desf.): Étude de l'accumulation de La Proline Au Cours Du Cycle de Développement. *Agronomie* **1986**, *6*, 583–590. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
67. Blum, A.; Ebercon, A. Cell Membrane Stability as a Measure of Drought and Heat Tolerance in Wheat¹. *Crop Sci.* **1981**, *21*, 43–47. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
68. Nandillon, R.; Lebrun, M.; Miard, F.; Gaillard, M.; Sabatier, S.; Morabito, D.; Bourgerie, S. Contrasted Tolerance of *Agrostis capillaris* metalicolous and Non-Metallicolous Ecotypes in the Context of a Mining Technosol Amended by Biochar, Compost and Iron Sulfate. *Environ. Geochem. Health* **2021**, *43*, 1457–1475. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
69. Pérez-Cid, B.; Lavilla, I.; Bendicho, C. Speeding up of a Three-Stage Sequential Extraction Method for Metal Speciation Using Focused Ultrasound. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *360*, 35–41. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
70. Malik, R.N.; Husain, S.Z.; Nazir, I. Heavy Metal Contamination and Accumulation in Soil and Wild Plant Species from Industrial Area of Islamabad, Pakistan. *Pak. J. Bot.* **2010**, *42*, 291–301. [[Google Scholar](#)]
71. Padmavathiamma, P.K.; Li, L.Y. Phytoavailability and Fractionation of Lead and Manganese in a Contaminated Soil after Application of Three Amendments. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 5667–5676. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
72. Li, Z.; Li, H.; Zhang, M.; Zhang, L.; Li, J.; Liu, J. Physiological and Molecular Responses of Tropical Seagrass *Enhalus acoroides* Exposed to Simultaneous High Temperature and Hypoxia Stress. *Mar. Environ. Res.* **2025**, *205*, 106997. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
73. Croce, R.; Carmo-Silva, E.; Cho, Y.B.; Ermakova, M.; Harbinson, J.; Lawson, T.; McCormick, A.J.; Niyogi, K.K.; Ort, D.R.; Patel-Tupper, D. Perspectives on Improving Photosynthesis to Increase Crop Yield. *Plant Cell* **2024**, *36*, 3944–3973. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
74. Rizvi, A.; Zaidi, A.; Ameen, F.; Ahmed, B.; AlKahtani, M.D.; Khan, M.S. Heavy Metal Induced Stress on Wheat: Phytotoxicity and Microbiological Management. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 38379–38403. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
75. Wang, L.; Rinklebe, J.; Tack, F.M.G.; Hou, D. A Review of Green Remediation Strategies for Heavy Metal Contaminated Soil. *Soil Use Manag.* **2021**, *37*, 936–963. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

Chapitre IV. Mise en place d'un procédé de phytostabilisation assistée : Expériences en pots

76. Zhang, W.; Niu, W.; Luo, H. Effect of Biochar Amendment on the Growth and Photosynthetic Traits of Plants Under Drought Stress: A Meta-Analysis. *Agronomy* **2024**, *14*, 2952. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
77. Mahmood, S.; Al-Solaimani, S.G.; Shams, S.; Naveed, S.; Haider, B.; Naveed, M.; Ali, R.; Waqas, M. Silicon and Biochar Synergistically Stimulate Nutrients Uptake, Photosynthetic Pigments, Gaseous Exchange and Oxidative Defense to Improve Maize Growth Under Salinity. *Water. Air. Soil Pollut.* **2024**, *235*, 413. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
78. Hasnain, M.; Munir, N.; Abideen, Z.; Zulfiqar, F.; Koyro, H.W.; El-Naggar, A.; Caçador, I.; Duarte, B.; Rinklebe, J.; Yong, J.W.H. Biochar-Plant Interaction and Detoxification Strategies under Abiotic Stresses for Achieving Agricultural Resilience: A Critical Review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2023**, *249*, 114408. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
79. Kumar, S.; Shah, S.H.; Vimala, Y.; Jatav, H.S.; Ahmad, P.; Chen, Y.; Siddique, K.H. Absciscic Acid: Metabolism, Transport, Crosstalk with Other Plant Growth Regulators, and its Role in Heavy Metal Stress Mitigation. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 972856. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Mashabela, M.D.; Masamba, P.; Kappo, A.P. Applications of Metabolomics for the Elucidation of Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Special Focus on Osmotic Stress and Heavy Metal Toxicity. *Plants* **2023**, *12*, 269. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
81. Sabir, A.; Naveed, M.; Bashir, M.A.; Hussain, A.; Mustafa, A.; Zahir, Z.A.; Kamran, M.; Ditta, A.; Núñez-Delgado, A.; Saeed, Q.; et al. Cadmium Mediated Phytotoxic Impacts in *Brassica napus*: Managing Growth, Physiological and Oxidative Disturbances through Combined Use of Biochar and *Enterobacter* sp. MN17. *J. Environ. Manag.* **2020**, *265*, 110522. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Lin, Y.; Lin, H.; Chen, Y.; Wang, H.; Ritenour, M.A.; Lin, Y. Hydrogen Peroxide-Induced Changes in Activities of Membrane Lipids-Degrading Enzymes and Contents of Membrane Lipids Composition in Relation to Pulp Breakdown of Longan Fruit during Storage. *Food Chem.* **2019**, *297*, 124955. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
83. Altaf, M.A.; Hao, Y.; Shu, H.; Mumtaz, M.A.; Cheng, S.; Alyemeni, M.N.; Ahmad, P.; Wang, Z. Melatonin Enhanced the Heavy Metal-Stress Tolerance of Pepper by Mitigating the Oxidative Damage and Reducing the Heavy Metal Accumulation. *J. Hazard. Mater.* **2023**, *454*, 131468. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
84. Anisimov, V.; Anisimova, L.; Krylenkin, D.; Dikarev, D.; Sanzharov, A.; Korneev, Y.N.; Kostyukov, I.; Kolyagin, Y.G. A Study on the Behavior of Cadmium in the Soil Solution-Plant System by the Lysimeter Method Using the ¹⁰⁹Cd Radioactive Tracer. *Plants* **2023**, *12*, 649. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
85. Graber, E.R.; Tsechansky, L.; Lew, B.; Cohen, E. Reducing Capacity of Water Extracts of Biochars and Their Solubilization of Soil Mn and Fe. *Eur. J. Soil Sci.* **2014**, *65*, 162–172. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
86. Lu, H.; Li, Z.; Fu, S.; Méndez, A.; Gascó, G.; Paz-Ferreiro, J. Combining Phytoextraction and Biochar Addition Improves Soil Biochemical Properties in a Soil Contaminated with Cd. *Chemosphere* **2015**, *119*, 209–216. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Yadav, P.; Ansari, M.W.; Gill, R.; Tuteja, N.; Gill, S.S. Arsenic Transport, Detoxification, and Recent Technologies for Mitigation: A Systemic Review. *Plant Physiol. Biochem.* **2024**, *213*, 108848. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Timofeeva, A.M.; Galyamova, M.R.; Sedykh, S.E. Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Plants* **2022**, *11*, 3065. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Cui, L.; Quan, G.; Yan, J.; Sui, F.; Wang, H.; Hina, K.; Abro, S.A.; Kitajima, N.; Kubota, H.; Tong, A. Synergistic Effects of Biochar and *Arabidopsis halleri* on Soil Cd and Pb Bioavailability and Uptake and Disposition. *BioResources* **2024**, *19*, 8324–8338. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
90. Anne, O.; Mockevičienė, I.; Karčauskienė, D.; Repšienė, R.; Šiaudinis, G.; Barčauskaitė, K.; Žilė, G. Biochar-Assisted Phytoremediation Potential of Sewage Sludge Contaminated Soil. *Sustainability* **2024**, *16*, 183. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
91. Gholizadeh, M.; Hu, X. Removal of Heavy Metals from Soil with Biochar Composite: A Critical Review of the Mechanism. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 105830. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
92. Mohtadi, A.; Schat, H. A Comparison of Nickel and Zinc Uptake and Translocation in Three Species of Brassicaceae: The Ni Hyperaccumulator *Odontarrhena corsica* and Two Non-hyperaccumulators, *Aurinia saxatilis* and *Lobularia maritima*. *Ecol. Res.* **2024**, *39*, 596–604. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
93. Van Der Ent, A.; Rylott, E.L. Inventing Hyperaccumulator Plants: Improving Practice in Phytoextraction Research and Terminology. *Int. J. Phytoremediat.* **2024**, *26*, 1379–1382. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

Chapitre V. Identification et caractérisation des souches bactériennes indigènes du site minier de Tamra

1. Introduction

Les sites miniers représentent des écosystèmes fortement perturbés, principalement en raison de la toxicité élevée et de la persistance des éléments traces présents. En particulier, les exploitations de minerais de fer génèrent une contamination importante qui dépasse largement la présence du seul Fe, pour inclure des éléments toxiques tels que le plomb (Pb), le cadmium (Cd), l'arsenic (As), et le manganèse (Mn) détectés à des concentrations préoccupantes (Soltani *et al.*, 2017 ; Hosseini *et al.*, 2018 ; Fazekašová & Fazekaš, 2020; Ayadi *et al.*, 2025). Cette pollution multi-élément entraîne une dégradation irréversible de la qualité des sols et constitue un défi environnemental majeur dans de nombreuses régions minières. Les impacts environnementaux associés à cette contamination sont particulièrement préoccupants. Ils se traduisent par une toxicité directe à l'égard de la microflore et de la faune édaphique, une diminution notable de la fertilité des sols, altération de leur structure ainsi qu'une perturbation des cycles biogéochimiques. Par ailleurs, le risque de transfert des polluants vers les systèmes aquatiques et ultimement, vers la chaîne alimentaire représente une menace majeure pour l'équilibre des écosystèmes (Dehkordi *et al.*, 2024; Edo *et al.*, 2024). De telles pressions multiples exposent ainsi les populations locales à des risques sanitaires importants. Face à la prise de conscience accrue des conséquences de la contamination des sols, les recherches se concentrent désormais sur le développement de technologies en vue de leur réhabilitation qui soient à la fois économiquement rentables et respectueuses de l'environnement. En effet, les approches traditionnelles de dépollution des sols telles que le confinement, le lavage des sols contaminés, ou la stabilisation à l'aide d'amendements minéraux, comportent plusieurs limites, à savoir des coûts élevés, une dégradation supplémentaire de la qualité du sol, une efficacité amoindrie à long terme et un déclin persistant des services écosystémiques (Liu *et al.*, 2024). Dans ce contexte, de nouvelles alternatives plus durables et compatibles avec le fonctionnement des écosystèmes sont devenues une véritable priorité scientifique et écologique. Parmi ces approches, la bioremédiation et la phytoremédiation constituent une solution durable ; cette double approche repose sur l'utilisation combinée des plantes et des microorganismes pour la réhabilitation des sols contaminés (Sekhohola-Dlamini *et al.*, 2022). Les bactéries tolérantes aux éléments traces métalliques (ETM) jouent un rôle central dans cette approche. Elles

développent divers mécanismes de résistance vis-à-vis des ETM, tels que les pompes d'efflux, la production d'exopolysaccharides (EPS), la biosorption et la séquestration intracellulaire, qui leur permettent de survivre dans des environnements contaminés tout en pouvant, dans certains cas améliorer la disponibilité des éléments nutritifs essentiels pour les plantes (Nnaji *et al.*, 2024 ; Sui *et al.*, 2024 ; Sun *et al.*, 2024 ; Oleńska *et al.*, 2025). Parmi les bactéries tolérantes aux ETM, on y retrouve celles favorisant la croissance des plantes PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) qui présentent un intérêt particulier. En effet, elles stimulent la croissance des plantes *via* la fixation de l'azote (N), la solubilisation du phosphate, la production de phytohormones telles que l'auxine ainsi que l'atténuation de l'impact réduction des stress abiotiques (Vocciante *et al.*, 2022 ; Dahnoun *et al.*, 2024). En complément de ces mécanismes microbiens, le biochar représente une approche prometteuse visant à réduire également ces effets (Imran *et al.*, 2022). Il suscite un intérêt croissant en tant qu'amendement organique des sols. Ce produit carboné issu de la pyrolyse de biomasses permet d'améliorer les propriétés physicochimiques des sols notamment la rétention d'eau, la capacité d'échange cationique, la teneur en matière organique, l'immobilisation et la réduction de la toxicité des ETM (Haile *et al.*, 2024; Upadhyay *et al.*, 2024; Ayadi *et al.*, 2025). Il offre également un environnement favorable aux microorganismes grâce à ses caractéristiques : 1) sa capacité à augmenter le pH des sols acides et à améliorer la disponibilité des éléments nutritifs permet de créer des conditions chimiques plus propices à leur croissance (Gorovtsov *et al.*, 2020; Dai *et al.*, 2021) ; 2) sa richesse en carbone organique constitue un substrat durable pour certains microorganismes, favorisant ainsi leur croissance (Dai *et al.*, 2021) ; 3) sa structure poreuse permet de créer des niches protectrices dans lesquelles ils pourront se développer et se protéger contre les conditions environnementales défavorables (Dai *et al.*, 2021) ; 4) sa capacité à améliorer la rétention de l'eau du sol, créant un microenvironnement plus humide, propice à la vie des microorganismes (Yadav & Ramakrishna, 2023); 5) sa grande surface spécifique permet de favoriser une meilleure colonisation des microorganismes, leur offrant de l'espace pour former des biofilms (Gorovtsov *et al.*, 2020) ; et finalement 6) sa capacité d'adsorption des ETM et/ou d'inhibition de leur toxicité permet de réduire le stress vis-à-vis des microorganismes (Gorovtsov *et al.*, 2020). Ces avantages facilitent leur installation et le développement de leurs activités. Cependant, leur efficacité peut être limitée lorsque ces deux

approches sont utilisées séparément dans les stratégies de réhabilitation. Leur association présente, par conséquent, un intérêt particulier, permettant de bénéficier de leurs doubles effets. Plusieurs études suggèrent une éventuelle synergie entre le biochar et les bactéries tolérantes, ouvrant le chemin à des stratégies combinées bioaugmentation-biochar (Kumar *et al.*, 2021; Heydari *et al.*, 2023; Zou *et al.*, 2024). En outre, des résultats encourageants ont révélé la tolérance vis-à-vis des ETM de plusieurs genres bactériens tels qu'*Agrobacterium*, *Paenibacillus* et *Pseudomonas*, qui possèdent divers mécanismes génétiques de résistance aux ETM et de fonctions PGPR (Sridevi & Raghuram, 2019; Harun *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2024). Cependant, les recherches demeurent limitées et d'autres études sont nécessaires notamment sur i) l'utilisation des espèces forestières tolérantes adaptées aux écosystèmes dégradés, telles que *Casuarina glauca*. Certaines études ont montré sa résistance à des conditions extrêmes telles que la salinité, la sécheresse, les ETM ainsi que la faible fertilité des sols (Ghazouani *et al.*, 2020; Laamari *et al.*, 2024; Ayadi *et al.*, 2025). Cependant, son utilisation reste limitée dans le contexte minier et, à notre connaissance, aucune étude n'a encore examiné ses performances en association à la fois avec des amendements organiques tels que le biochar et les inoculants bactériens; ii) Bien que de nombreuses études ont montré l'efficacité des combinaisons biochar-bactéries pour la réhabilitation des sols miniers, la plupart de ces études ont été menées dans des contextes européens et asiatiques, qui se caractérisent par des climats humides et des sols acides. Cependant, le contexte minier nord-africain présente des caractéristiques particulières, notamment des climats arides et semi-arides ainsi que des sols alcalins et pauvres en matière organique, pouvant ainsi influencer considérablement l'efficacité du biochar. Ces particularités soulignent la nécessité des études ciblées dans les environnements miniers nord-africains, en particulier en Tunisie ; iii) l'étude des stratégies intégrées associant les bactéries isolées des sols contaminés, leur caractérisation des traits PGPR, des essais de tolérance multi-métaux et la bioaugmentation dans les conditions réelles (*in situ*).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude a consisté à évaluer l'effet combiné biochar-bactéries sur la germination des graines de *C. glauca* endémiques en tant que preuve de concept pour une phytoremédiation assistée. De manière spécifique, elle visait à :

- Isoler et sélectionner les souches bactériennes tolérantes aux ETM étudiés issues des sols miniers de Tamra ;

- Évaluer les traits PGPR des isolats sélectionnés afin d'identifier un candidat le plus prometteur pour la croissance des plantes ;
- Identifier au niveau moléculaire les souches sélectionnées et relier leur affiliation taxonomique à leurs fonctions connues ;
- Évaluer l'effet combiné du biochar d'*Eucalyptus* et de bactéries sur la germination et la vigueur des plantules de *C. glauca*, sous conditions contrôlées et sans ajout des ETM

Cette étude présente un caractère original par son approche intégrée, qui utilise une souche bactérienne isolée du sol minier de Tamra, des graines endémiques de *C. glauca* et du biochar issu d'une biomasse locale afin d'évaluer le potentiel de cette combinaison synergique. Elle s'inscrit dans un contexte minier nord-africain représentatif, encore peu étudié. Ce travail a pour ambition de fournir des bases scientifiques solides en vue de développer des stratégies de phytomanagement adaptées aux sites miniers nord-africains contaminés par les ETM.

2. Matériel et méthodes

2.1. Isolement des bactéries

La méthode d'échantillonnage et les caractéristiques géochimiques des 9 sols (T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra, T4, T5 et T6 : au milieu de la mine et T7, T8, T9 : en aval de la mine) utilisés dans cette étude ont été initialement décrites dans l'article (§ 2.1). Un gramme de chaque sol testé a été mélangé avec 10 ml de la solution saline (NaCl à 0,9 %), afin de mettre en suspension les microorganismes présents tout en préservant leur intégrité cellulaire grâce à un environnement osmotiquement équilibré. Après 24 heures d'incubation avec agitation à $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, 100 μl de surnageant ont étéensemencés sur gélose LB composée (pour 1L) de 10 g de tryptone, 5g d'extrait de levure et 5 g de chlorure de sodium. Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 72 heures à l'obscurité (à 28°C). Toutes les colonies qui présentent des caractéristiques morphologiques différentes dans la même boîte ont été réisolées puis mises en culture dans 2 ml de milieu LB pendant 24 heures (à 28°C).

2.2. Tolérance des isolats aux ETM

2.2.1. Évaluation de la tolérance des souches aux ETM sur milieu LB liquide

Six éléments traces, à savoir le Fe, le Zn, le Mn, le Pb, le Cd et l'As ont été testés à des

concentrations différentes afin d'évaluer le niveau de tolérance de 13 isolats bactériens. Un premier test de sélection a été mené afin d'identifier les souches bactériennes les plus tolérantes aux éléments les plus toxiques présents dans le sol minier de Tamra, à savoir Pb, Cd et As. A cet effet, des solutions mères ont été préparées pour chaque métal de 5 g/L à partir de CdCl_2 pour le Cd et PbCl_2 pour le Pb et une solution mère de 20 g/L à partir de Na_3AsO_3 pour l'As (SIGMA-ALDRICH (France)). Ces solutions mères ont été ensuite diluées dans du LB (liquide) pour avoir les concentrations suivantes : 0, 5, 10, 30 et 50 mg/L. Ces dilutions ont été distribuées dans les puits d'une μ plaque de 24 puits stérile (Sarstedt), à raison de 1 ml par puits. La même quantité de bactéries a été distribuée dans les cinq puits de la même ligne, de manière à avoir au début de l'expérience une absorbance (à 600nm) de 0,01. Les μ plaques ont été incubées à 25°C dans un agitateur orbital à 250 rpm (Heidolph, INKUBATOR 1000, Allemagne). La turbidité des suspensions bactériennes a été mesurée à une absorbance de 600nm au début de l'expérience (avant l'incubation, $t = 0$ h) et après 24 heures d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Allemagne) équipé du logiciel d'analyse de données MARS (version V5.02 R3). Cette approche nous permet d'évaluer la tolérance globale des souches aux éléments étudiés.

Les souches les plus tolérantes à la plus forte concentration (50 mg/L) de Pb, Cd et As ont été sélectionnées pour déterminer dans un second temps, leur résistance en milieu liquide à différentes concentrations (0, 50, 100, 300 et 500 mg. L^{-1}) de Fe, Zn et Mn. Ces métaux sont naturellement présents dans les sols miniers de Tamra à des concentrations très élevées par rapport à celles de Pb, Cd, et As (§ 2.1). Une solution mère de 20 g/L de chacun des sels métalliques a été préparée à partir de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pour le Fe, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pour le Zn et $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pour le Mn (SIGMA-ALDRICH (France)). Les étapes expérimentales suivies dans ce second essai sont identiques à celles décrites précédemment pour les premiers éléments étudiés (Pb, Cd et As).

2.2.2. Évaluation de la tolérance des souches aux ETM sur milieu LB solide

En complément de l'évaluation de la tolérance globale des isolats en culture liquide, des essais de tolérance sur milieu LB solide additionné par des sels métalliques de Fe, Mn, Pb, Zn, Cd et As et pour les mêmes concentrations testées en milieu liquide, ont été menés afin d'évaluer la croissance des souches et étudier la tolérance individuelle de celles-ci. Quatre concentrations

de chaque élément ont été testées : pour le Fe, Mn et Zn :50, 100, 300 et 500 mg/L, et le Pb, Cd et As : 5, 10, 30 et 50 mg/L. Un témoin a été également préparé (LB sans métal) afin de servir de référence pour évaluer l'impact des éléments examinés sur la croissance des souches. Les pré-cultures des souches sélectionnées ont été réalisées à 28°C dans 10 ml de LB sous agitation (150 tr/min) afin d'obtenir des biomasses fraîches. La turbidité de chaque souche a été mesurée puis ajustée pour avoir une absorbance de 0,05 à 600nm. Ainsi, 20 µl de chaque suspension ont été déposés sur la gélose LB à l'aide d'une micropipette stérile, en trois exemplaires par condition. Après 48 heures d'incubation à 25°C, le nombre d'UFC (unités formant colonie) a été déterminé par la méthode de dilution en série après comptage des colonies (UFC/ml) et il a été calculé comme suit (Bhuyan *et al.*, 2023) :

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Nombre de colonies comptées}}{\text{Volumeensemencé} \times \text{Facteur de dilution}}$$

2.2.3. Évaluation de la tolérance des souches à un mélange des éléments traces

Des cultures fraîches des souches sélectionnées ont été préparées (incubation sous agitation ,150 tr/min) pendant une nuit à 28°C). La croissance microbienne de chaque souche a été ensuite vérifiée par la mesure de l'absorbance à 600 nm puis ajustée pour avoir une absorbance de 0,05 afin de garantir une mesure précise et linéaire de la densité cellulaire. Cette étape est nécessaire pour éviter les perturbations liées à des concentrations excessives ou insuffisantes. Dans la présente étude, trois solutions de mélanges des éléments traces (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) ont été testées. Ces solutions correspondent à : (1) la moitié de la concentration moyenne extractible (par CaCl₂) des ETM mesurée dans les neuf sols prélevés du site minier de Tamra (0,5T) (§ 2.1), (2) la concentration moyenne extractible mesurée dans ces sols (1T) et (3) deux fois la concentration moyenne extractible (2T). Le mélange T est composé de Fe (289,04 mg/L), Zn (496,70 mg/L), Mn (381,77 mg/L), Pb (0,74 mg/L), Cd (0,96 mg/L), et As (51,05 mg/L). Ces solutions ont été élaborées à partir des solutions mères préparées (§ 2.2.1). Les mélanges métaux-milieu LB ont été stérilisés à l'aide de filtres seringue (0,22µm) puis distribués dans des microplaques de 24 puits stériles (Sarstedt), à raison de 1 ml par puits. La suspension bactérienne a été ajustée de manière à obtenir une densité optique initiale de 0,05 ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Pour chaque isolat, trois répétitions ont été réalisées à chaque concentration testée, en incluant deux contrôles : LB sans éléments traces et LB sans inoculum. L'absorbance des suspensions a

été mesurée à 600 nm avant et après l'inoculation (à $t = 0h$), puis après 4 heures et 24 heures d'incubation. Afin d'évaluer la vitesse relative d'augmentation de nombre de cellules bactériennes, le taux de croissance spécifique (μ , h^{-1}), a été calculé à partir de la pente de $\ln(DO_{600})$ en phase exponentielle selon la formule suivante (Huang, 2008) :

$$\mu (h^{-1}) = \frac{(\ln DO_2 - \ln DO_1)}{t_2 - t_1}$$

Où DO_1 et DO_2 : densité optique (600 nm) des cultures bactériennes au temps ; t_1 et t_2 : temps correspondants (h).

La tolérance des souches aux éléments traces étudiés constitue un premier indicateur de leur capacité d'adaptation aux conditions extrêmes. Toutefois, l'évaluation de leurs principaux traits PGPR s'avère également essentielle afin de mieux appréhender leur potentiel à favoriser la croissance végétale dans un contexte de phytoremédiation.

2.3.Traits PGPR chez les souches bactériennes isolées et sélectionnées du sol minier de Tamra

L'évaluation de quelques traits PGPR des souches sélectionnées est une étape clé pour étudier leur capacité à stimuler la croissance de la plante en tant qu'agents de bioremédiation.

2.3.1. Fixation de l'azote

L'azote (N) est un nutriment indispensable à la croissance et au développement des plantes (Voccianti *et al.*, 2022). Dans la présente étude, la capacité des souches à fixer l'azote a été testée sur un milieu minéral solide sans azote (milieu de Winogradsky). Ce milieu a été préparé selon la méthode de Hino & Wilson (1958) à partir d'une solution stock (pH 7,2) contenant (g/L) : KH_2PO_2 (50), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (25), NaCl (25), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (1). Pour 1 L, 5 ml de cette solution ont été mélangés avec 0,5 g de glucose et 0,1 $CaCO_3$, puis ajustés à pH 6,2 avec l'acide sulfurique (H_2SO_4). Le milieu a ensuite été solidifié avec 1,5 % d'agar. Un volume de 10 μl de la culture de chaque isolat testé a été déposé sur le milieu solide de Winogradsky, puis incubé à 30°C pendant 48 heures. Toute croissance sur ce milieu traduit la capacité des souches testées à fixer l'azote.

2.3.2. Production de NH_4^+

L'ammonium (NH_4^+) est un composé essentiel pour améliorer la disponibilité de l'azote. Cette forme de N est facilement absorbée par la plante et rapidement convertie en nitrate assimilable, assurant ainsi un apport continu en azote minéral essentiel à la croissance des végétaux (Vocciante *et al.*, 2022).

La production de NH_4^+ a été déterminée selon la méthode de Berthelot. Les souches testées ont été cultivées dans un milieu liquide de Burk (20 g saccharose, 0,64 g K_2HPO_4 , 0,16 g KH_2PO_4 , 0,20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,20 g NaCl, 0,05g $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 ml $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), 5 ml $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3%)) sous agitation (180 tr/min) à 30°C (Ha *et al.*, 2018). Après 48 heures d'incubation, le milieu a été centrifugé à 10 000 tr/min pendant 2 min à 4°C. Les surnageants ont ensuite été récupérés et la concentration de NH_4^+ a été déterminée en rajoutant du réactif de Berthelot. L'intensité de la couleur brun-jaunâtre de la solution correspond à la quantité d'ammonium. Une gamme étalon a été parallèlement préparée avec différentes concentrations de NH_4^+ (0, 22,3, 44,6, 89,3, 179, 357 et 714 nmol. L^{-1}). Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 690 nm et la concentration de NH_4^+ produite pendant la réaction a été finalement déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage établie.

2.3.3. Solubilisation du phosphate

Le phosphore est un élément essentiel pour la croissance et le développement des plantes, mais il est très peu disponible dans le sol. Il est naturellement présent sous ses formes organiques ou inorganiques peu solubles et par conséquent ne peuvent être absorbées par les racines des plantes (Rawat *et al.*, 2020). Certaines bactéries permettent de solubiliser le P, ce qui augmente sa biodisponibilité en stimulant ainsi la croissance des plantes. La capacité des isolats testés a été déterminée selon la méthode de Nautiyal (1999) à partir du milieu de Pikovskaya (PVK) contenant (pour 1L) 10 g glucose, 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g NaCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl, 0,5 g extrait de levure, 0,002 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,002 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1,5 % agar (Pikovskaya, 1948). Le phosphate tricalcique insoluble ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) a été utilisé comme une source de phosphate dans ce milieu. Après avoir ajusté les absorbances des cultures à la même valeur, 10 μl de chaque isolat testé ont été déposés sur la gélose PVK, puis incubés à

30°C pendant 24 heures. La présence d'un halo autour de la colonie indique la solubilisation des phosphates. L'indice de solubilisation des phosphates (ISP) a été calculé comme suit :

$$ISP = \frac{Dh}{Dc}$$

Où Dh : diamètre des halos autour des colonies et Dc : diamètre de ses colonies respectives.

Si : $ISP < 2$: la solubilisation du phosphate est faible ; $2 \leq ISP < 3$: la solubilisation du phosphate est moyenne et si $ISP \geq 3$: la solubilisation du phosphate est forte.

2.3.4. Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La phytohormone acide indole-3-acétique (AIA) est une auxine jouant un rôle essentiel dans l'interaction entre les plantes et les bactéries (Kunkel & Harper, 2018). Sa production de l'auxine a été déterminée sur milieu LB supplémenté en tryptophane (milieu TSB) selon la méthode décrite par Rajkumar *et al.* (2008). Après incubation sous agitation (180 tr/min) à 28 °C pendant 24 heures, les cultures ont été centrifugées à 5000 g pendant 10 minutes. Un volume de 500 µl de suspension de chaque isolat a été déposé dans la microplaque de 96 puits (en triplicat) puis mélangé à 500 µl de réactif de Salkowski, préparé selon la méthode de Gordon & Weber (1951). Après une incubation à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 530 nm. La concentration d'auxine a ensuite été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage préparée à partir d'une série de dilutions de la solution mère d'auxine (acide indole acétique, 99 %) dans une plage comprise entre 0 et 250 µg. L⁻¹.

2.4. Identification des souches bactériennes

L'extraction de l'ADN génomique des souches sélectionnées a été réalisée à l'aide du kit Nucleospin® microbial DAN (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. La qualité et la concentration des ADNg préparés sont vérifiées par des mesures spectrophotométriques (Nanodrop™).

L'identification au niveau moléculaire a été faite pour déterminer le genre des souches isolées. Pour ce faire, la technique PCR (Polymerase chain reaction) a été choisie ; le gène codant l'ARN

ribosomal 16S a été choisi, avec les amorces 16S-27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 16S-1492r (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') (Marchesi *et al.* 1998). La réaction de PCR a été réalisée avec l'enzyme Q5-High fidelity DNA polymérase (NEB Q5® Reaction Buffer Pack) ; dans 25 µL de réaction avec 1x Q5 buffer, 0,5 µM amorce forward, 0,5 µM amorce reverse, < 1 µg ADN purifié et de l'eau ultrapure stérilisée par filtration (0,2 µm). L'amplification a été faite à l'aide d'un thermocycleur MJ-Mini Biorad dans les conditions suivantes ; 1 cycle de dénaturation à 98°C durant 1 min, suivi de 35 cycles comprenant chacun, une dénaturation à 98°C pendant 15 s, une hybridation à 56°C pendant 15 s et enfin une amplification à 72°C pendant 1 min, un dernier cycle d'élongation à 72°C pendant 2 min et finalement un cycle de conservation de la réaction à 12°C. Les produits de l'amplification sont séparés par taille par électrophorèse en gel d'agarose à une concentration de 1,5% (en tampon TAE) pour un temps de migration de 45 min environ, à 100 V dans un système d'électrophorèse (Mupid®-ONE, Dutscher). Les amplifiants sont visualisés et photographiés à l'aide d'un transilluminateur (UV-transilluminateur, Fisher Scientific) après la coloration du gel au bromure d'éthidium. Un volume de 15 µL de chaque amplifiât obtenu a été envoyé à un prestataire de séquençage (Eurofins Genomics). Les séquences obtenues, par la méthodologie de séquençage Sanger, sont visualisées et analysées avec l'aide du logiciel Chromas (Version 2.6.6, Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australie). Les séquences nucléotidiques obtenues sont soumises à une analyse BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI-NLM Bethesda, MD 20894, États-Unis ; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) contre la base de données de rRNA/ITS du NCBI. Le genre bactérien qui montre la similitude la plus élevée (> 99%) avec la séquence soumise est considéré comme le genre le plus probable pour la souche isolée.

2.5. Effet combiné de la souche sélectionnée et d'un extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus* sur la germination des graines de *Casuarina glauca*

Sur la base des résultats des expériences précédentes, la souche bactérienne présentant à la fois une tolérance aux éléments traces contenus dans le sol minier de Tama et les traits PGPR étudiés a été retenue pour la présente étude. Un test a été mené, en associant la souche sélectionnée et

l'extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus* (BEu) afin d'évaluer leur effet combiné sur la germination des graines endémiques de la plante hôte (*C. glauca*). L'extrait de biochar d'*Eucalyptus* a été préparé à partir de BEu stérilisé (autoclavage à 121°C pendant 20 min) (Nadieline *et al.*, 2023) puis mélangé avec l'eau ultrapure stérile (ratio 1 :10 p/v) (Gascó *et al.*, 2016 ; Shumaila *et al.*, 2023). La suspension a été ensuite mise sous agitation à 150 tr/min pendant 24 heures (à 25°C). Par ailleurs, la culture de la souche sélectionnée a été incubée à 30°C dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de LB liquide (0,05 U Abs) pendant 48 heures sous agitation (150 tr/min). La croissance microbienne de la souche testée a été vérifiée par mesure d'absorbance à 600 nm. Après culture jusqu'à mi-phase exponentielle (DO600 1,2), la suspension a été ensuite centrifugée à 3000 rpm pendant 10 minutes, puis les cellules ont été soigneusement lavées avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les résidus du milieu de culture avant d'être utilisées comme inoculum. Le culot bactérien obtenu a été réparti dans deux tubes : dans le premier, il a été mélangé avec l'extrait aqueux de BEu et dans le second avec de l'eau stérile en respectant la densité initiale d'inoculum de 10^7 (UFC/ml) (Ayyub *et al.*, 2024). Les suspensions ont été homogénéisées en les agitant doucement à l'aide d'un vortex. Les graines endémiques de *C. glauca* ont été sélectionnées selon la norme ISTA (International Safe Transit Association) (ISTA,1999) puis stérilisées à l'aide de l'eau oxygénée 3 % pendant 20 minutes. Les graines stérilisées ont été ensuite placées sur les papiers filtres dans des boîtes de pétri (9 cm de diamètre) et imbibées par 2 ml de quatre traitements différents, à raison de 20 graines par boîte : (1) eau stérile (sans inoculum et sans BEu), (2) l'extrait aqueux de BEu, (3) la suspension du culot bactérien et l'eau stérile, (4) la suspension du culot bactérien et l'extrait aqueux de BEu. Au final, cinq boîtes ont été préparées pour chaque traitement (correspondant à 100 graines par conditions expérimentales). Ces boîtes ont été incubées dans l'obscurité à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à stabilisation du taux de la germination des graines. L'humidité du papier filtre a été contrôlée régulièrement tout au long de l'incubation.

Le pourcentage de germination des graines (G %), l'indice de vigueur (SVI), la moyenne journalière de germination (Germination Daily Mean ; GMD) ont été calculés comme suit :

$$G (\%) = \left(\frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Nombre de graines testées}} \right) \times 100 ; \text{ (ISTA,1999)}$$

$$SVI = G (\%) \times \text{longueur des plantules} ; \text{ (Abdul-Baki \& Anderson, 1973)}$$

$$\text{GMD} = \frac{\text{Pourcentage de germination}}{\text{nombre de jours à la germination finale}} ; (\text{Maguire, 1962})$$

2.6. Analyses statistiques

Le logiciel XLSTAT (version 2021.5) a été utilisé pour analyser les données. Toutes les moyennes ont été comparées à l'aide du test d'analyse de variance Anova suivi d'un test LSD (Least Significant Difference) protégé à $p < 0,05$. Les données ont été présentées sous forme de la moyenne $\pm$ écart type.

3. Résultats

3.1. Isolement et caractérisation des souches bactériennes

Dans la présente étude, l'isolement des souches bactériennes a été réalisé sur gélose LB à partir des surnageants des neuf sols miniers (T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra, T4, T5 et T6 : au milieu de la mine de Tamra et T7, T8, T9 : en aval de la mine de Tamra) suspendus dans une solution saline stérile (NaCl à 0,9 %). Après 24 heures d'incubation à 25°C, huit boîtes ont révélé des colonies présentant des caractéristiques morphologiques différentes (couleurs, formes, tailles) (Figure V.1a). Ainsi, des ré-isolements successifs des colonies retenues ont finalement permis d'obtenir 13 souches bactériennes pures, désignées T1, T2, T3.1, T3.2, T4, T5.1, T5.2, T6.1, T6.2, T7, T8, T9.1 et T9.2 (Figure V.1b). Le premier chiffre après la lettre « T » désigne le site d'origine de l'isolat, tandis que le deuxième chiffre indique l'ordre d'isolement de la souche parmi les différents isolats obtenus dans le même site.

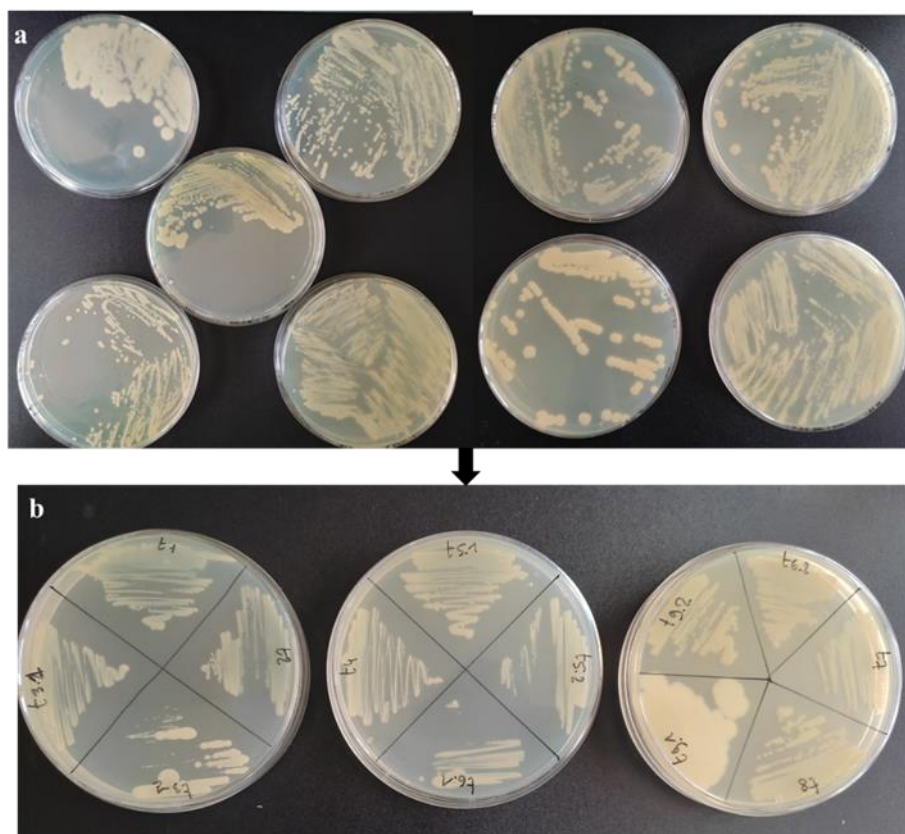


Figure V. 1. Étapes d'isolement de souches bactériennes à partir des sols miniers de Tamra: **a)** colonies bactériennes obtenues sur gélose LB à partir du surnageant des sols miniers suspendus dans une solution saline (NaCl à 0,9%) après incubation 24h à 25°C ; et **b)** ré-isolements des colonies bactériennes sélectionnées conduisant à l'obtention de 13 souches pures (T1, T2, T3.1, T3.2, T4, T5.1, T5.2, T6.1, T6.2, T7, T8, T9.1, et T9.2).

Parmi les 13 souches isolées des sols miniers de Tamra, une étude préliminaire a été menée afin de sélectionner celles présentant la plus grande tolérance aux éléments les plus toxiques du site (Pb, Cd et As) à différentes concentrations (0, 5, 10, 20, 30, 50 mg. L⁻¹). La sélection a été basée sur la tolérance de ces souches à la concentration la plus élevée (50 mg. L⁻¹). Sept souches (T1, T4, T5.1, T5.2, T6.1, T6.2 et T8) étaient sensibles aux éléments testés (Tableau V.1). En revanche, les souches T2, T3.1, T3.2 présentaient une tolérance à la fois à As et au Pb, la souche T7 à As et au Cd, tandis que les deux souches T9.1 et T9.2 sont résistantes au Cd et au Pb respectivement (Tableau V.1). Six isolats (T2, T3.1, T3.2, T7, T9.1 et T9.2) ont finalement été sélectionnés sur la base de leur tolérance aux éléments étudiés (Pb, Cd et As) pour une étude plus approfondie de la métallotolérance. Les six souches sélectionnées (T2, T3.1, T3.2, T7, T9.1 et T9.2) ont été soumises à une évaluation de leur tolérance en milieu liquide à des concentrations croissantes de Fe, Zn et Mn (0, 50, 100, 300 et 500 mg. L⁻¹) afin de caractériser

Chapitre V. Identification et caractérisation des souches bactériennes indigènes du site minier de Tamra

leur résistance aux métaux et leur capacité d'adaptation à des conditions de stress métalliques comparables à celles du sol minier étudié.

Tableau V. 1. Évaluation de la tolérance des souches isolées des sols miniers de Tamra vis-à-vis du plomb, du cadmium ou de l'arsenic à la concentration de 50 mg. L⁻¹.

Souches testées	50 (mg. L ⁻¹)		
	As	Cd	Pb
T1	-	-	-
T2	+	-	+
T3.1	+	-	+
T3.2	+	-	+
T4	-	-	-
T5.1	-	-	-
T5.2	-	-	-
T6.1	-	-	-
T6.2	-	-	-
T7	+	+	-
T8	-	-	-
T9.1	-	+	-
T9.2	-	-	+

+ : tolérante ; - : sensible

Le choix de ces métaux a été guidé par leur abondance dans les sols miniers de Tamra. La croissance des souches en culture liquide a été suivie en déterminant leur densité optique (DO) mesurée à la longueur d'onde de 600 nm. Cette méthode est l'un des moyens les plus simples de déduire la densité microbienne (nombre des micro-organismes). Les résultats montrent que toutes les souches testées étaient résistantes à la concentration la plus élevée en Fe (500 mg. L⁻¹) (Figure V.2a), avec un ordre de croissance : T3.1 > T3.2 > T9.1 > T7 > T9.2 > T2. Par ailleurs, la souche T2 était la plus affectée par le Fe aux différentes concentrations testées. De même, toutes les souches étaient résistantes au Zn pour les concentrations testées dans cette étude, à l'exception de la souche T3.2, qui a eu la croissance la plus faible (Figure V.2b). La souche T7 a présenté une tolérance remarquable avec une croissance substantielle jusqu'à 500 mg. L⁻¹. Pour le Mn, les résultats montrent que la souche T3.1 était celle qui s'était le plus développée à la plus forte concentration testée (500 mg. L⁻¹) (Figure V.2c). Cependant, la résistance des souches T2, T3.2, T7 et T9.2 s'étend jusqu'à 50 mg. L⁻¹ alors que la souche T9.2 présente une croissance importante jusqu'à 100 mg. L⁻¹.

Chapitre V. Identification et caractérisation des souches bactériennes indigènes du site minier de Tamra

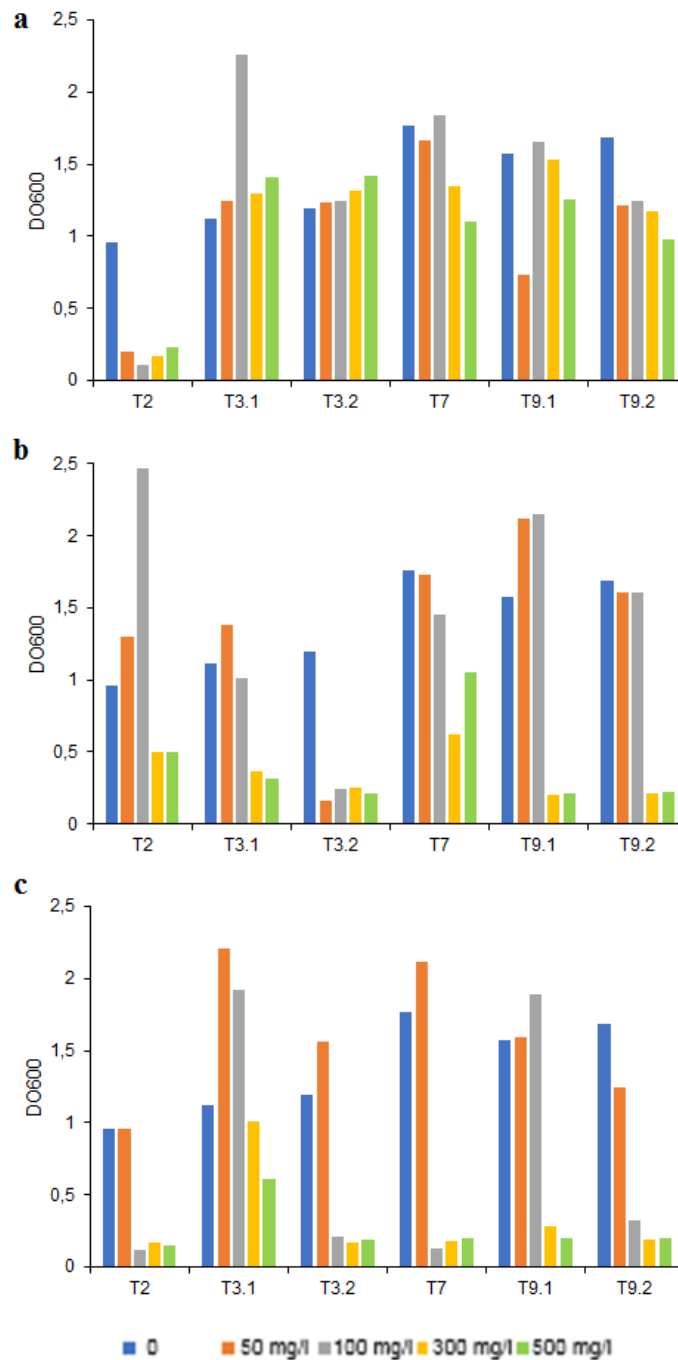


Figure V. 2. Densités optiques (mesurées à 600nm) des cultures (après 24 heures) des six souches sélectionnées (T2, T3.1, T3.2, T7, T9.1 et T9.2) en présence de différentes concentrations des éléments étudiés (à 0, 50, 100, 300 et 500 mg/l) : **a)** fer (Fe), **b)** zinc (Zn), **c)** manganèse (Mn).

En complément des mesures en milieu liquide du développement des isolats, qui permet d'étudier leur tolérance globale par la mesure du trouble (dû aux bactéries) à l'aide d'un

spectrophotomètre (DO600), l'évaluation sur milieu solide permet de visualiser la formation de colonies, de détecter les différences phénotypiques entre les isolats testés et de confirmer leur tolérance individuelle. Des essais de tolérance sur le milieu LB solide additionné des éléments traces étudiés (Fe, Mn, Pb, Zn, Cd et As) ont été réalisés afin d'évaluer leur croissance en présence de Fe, Mn et Zn à 50, 100, 300 et 500 mg. L⁻¹ et en présence de Pb, Cd et As à 5, 10, 30 et 50 mg. L⁻¹. Les isolats bactériens testés ont montré une résistance variable en fonction de l'élément étudié et de sa concentration. Après 48 heures d'incubation, on a constaté une tolérance maximale pour toutes les souches vis-à-vis du Fe à 500 mg. L⁻¹, du Mn à 300 mg. L⁻¹, du Zn à 100 mg. L⁻¹, du Pb et d'As à 50 mg. L⁻¹, alors que celle du Cd s'est limitée à 10 mg. L⁻¹ (Figure V.3a). Les dénombrements des colonies bactériennes (CFU/ml) aux concentrations maximales tolérées ont montré que toutes les souches maintiennent une croissance significative (avec plus de 2. 10⁸ CFU/ml) en présence de 50 mg. L⁻¹ de Pb par rapport au témoin (milieu LB sans ETM). Ceci met en évidence leur remarquable potentiel de tolérance et d'adaptation à ce métal (Figure V.3b). Par ailleurs, pour le Cd, les dénombrements bactériens des souches T2, T3.1, T3.2 et T7 étaient significativement plus élevés que ceux observés dans le milieu LB (sans ETM), suggérant des mécanismes de tolérance spécifiques au Cd. De même, les souches T2, T3.1 et T9.2 ont montré une tolérance accrue à l'As, alors qu'aucune différence significative n'a été enregistrée pour la souche T7 par rapport au témoin. En outre, bien que tous les isolats se soient développés en présence de concentrations élevées de Fe (500 mg. L⁻¹), Mn (300 mg. L⁻¹) et Zn (100 mg. L⁻¹), les densités cellulaires mesurées sont apparues significativement inférieures à celles obtenues en milieu LB, ce qui indique une sensibilité plus importante à ces concentrations pour ces métaux. Ces souches présentant la plus grande tolérance aux éléments étudiés (T2, T3.2, T7 et T9.2) ont été choisies pour tester leur résistance à différents mélanges des éléments traces présents dans les sols miniers de Tamra.

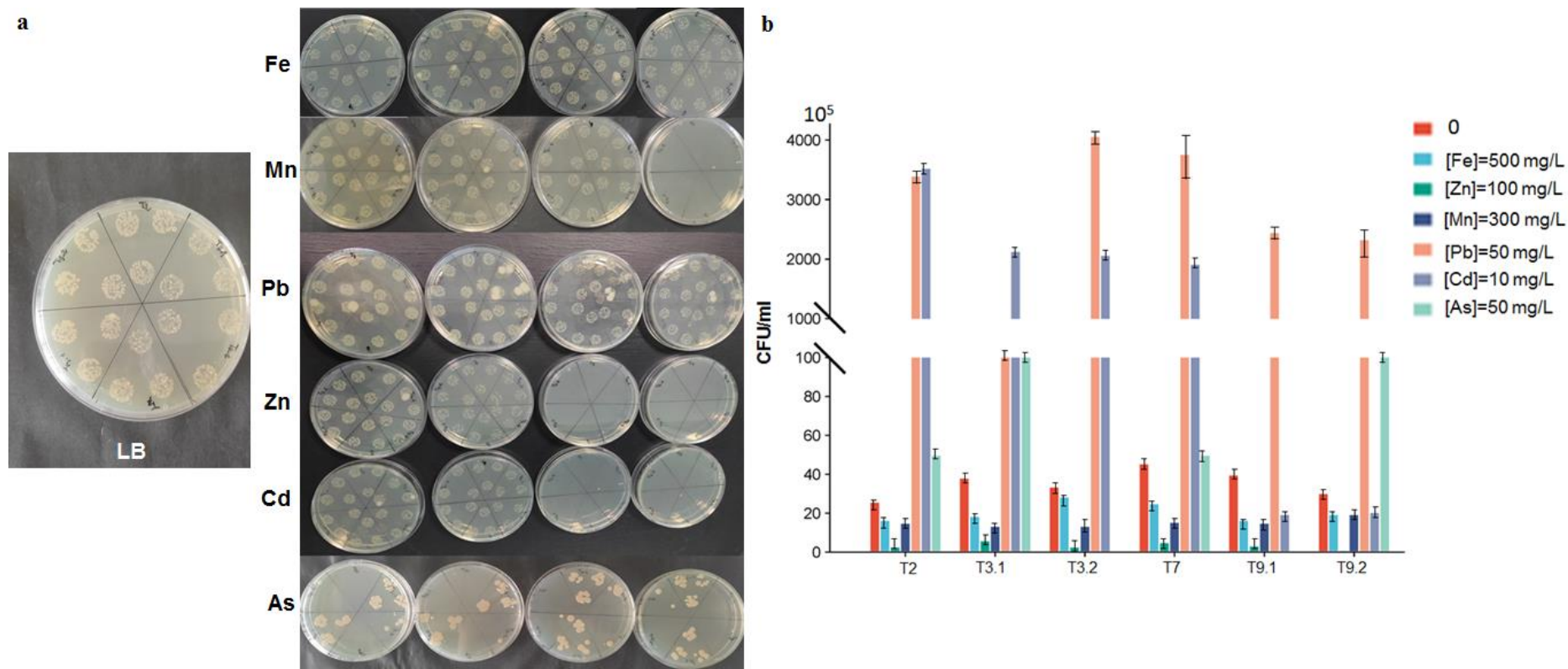


Figure V. 3 a) Tests *in vitro* des éléments traces étudiés (Fe, Mn, Pb, Zn, Cd et As) d'évaluation de la croissance (sur milieu LB) des six isolats testés en présence de différentes concentrations de Fe, Mn ou Zn (50, 100, 300, et 500 mg/L) ou bien en présence de Pb, Cd et As (5, 10, 30 et 50 mg/L); **b)** dénombrement des colonies bactériennes (CFU/ml) pour les plus fortes concentrations en ETM tolérée, après 48 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne $\pm$ écart type (n=3).

Chapitre V. Identification et caractérisation des souches bactériennes indigènes du site minier de Tamra

L'évaluation de la tolérance des isolats sélectionnés (T2, T3.2, T7 et T9.2) à différents mélanges des éléments traces présents dans le sol minier de Tamra est une étape nécessaire pour tester leur résistance aux conditions toxiques réelles du site d'étude. Afin d'y parvenir, trois niveaux de concentrations ont été testés : (1) la moitié de la concentration moyenne des ETM extractibles (à l'aide de CaCl_2) mesurées dans les sols de Tamra (0,5T), (2) celle correspondant précisément aux concentrations retrouvées dans les sols de Tamra (1T) et (3) finalement, deux fois la concentration extractible des ETM des sols de Tamra (2T).

Les résultats obtenus (Figure V.4) montrent que la croissance de la souche T2 est faible à la moitié de la concentration des ETM mesurée dans le sol de Tamra (Fe ($144,52 \text{ mg. L}^{-1}$), Zn ($248,35 \text{ mg. L}^{-1}$), Mn ($190,88 \text{ mg. L}^{-1}$), Pb ($0,37 \text{ mg. L}^{-1}$), Cd ($0,48 \text{ mg. L}^{-1}$), As ($25,52 \text{ mg. L}^{-1}$)) mais s'améliore lorsque la concentration du mélange atteint celle du site minier de Tamra (1T). À la concentration « 2T », la vitesse de croissance spécifique (μ , h^{-1}), calculée à partir de la pente de $\ln(\text{DO}_{600})$ en phase exponentielle selon $\mu = (\ln \text{DO}_2 - \ln \text{DO}_1) / (t_2 - t_1)$, a diminué pour cette souche mais reste supérieure à celle observée à 0,5T, bien qu'elle soit toujours inférieure à la croissance en milieu LB (témoin).

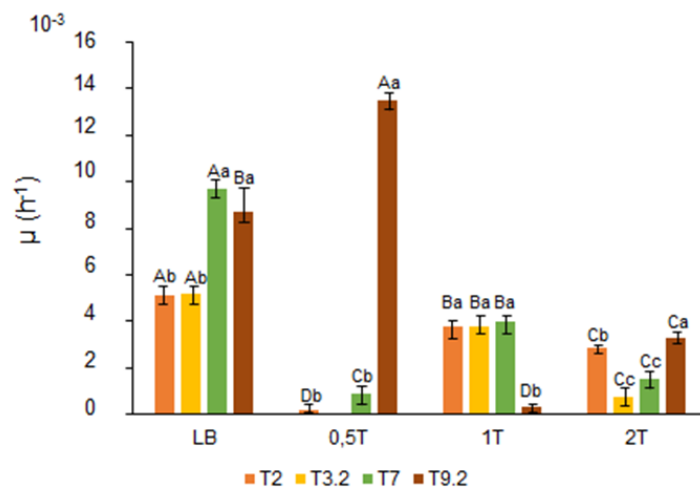


Figure V. 4. Vitesse spécifique de croissance des souches (μ , h^{-1}) pour les souches T2, T3.2, T7 et T9.2 en présence d'un cocktail des éléments traces à différentes concentrations : LB : milieu de culture nutritif sans ETM ajoutés ; 0,5T : la moitié de la concentration des ETM mesurée dans le sol de Tamra ; 1T : concentration des ETM du sol de Tamra ; et 2T : deux fois la concentration des ETM du sol de Tamra. Le cocktail des éléments étudiés comprend : Fe ($289,04 \text{ mg/L}$), Zn ($496,7 \text{ mg/L}$), Mn ($381,77 \text{ mg/L}$), Pb ($0,74 \text{ mg/L}$), Cd ($0,96 \text{ mg/L}$), As ($51,05 \text{ mg/L}$). Les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les isolats de la même concentration testée et les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les isolats de différentes concentrations selon le test LSD ($p < 0,05$). Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne $\pm$ écart type ($n=3$).

La souche T3.2 présente, pour toutes les concentrations testées (0,5T, 1T, 2T), des performances inférieures significativement à celles du milieu LB (témoin), suggérant une tolérance plus limitée au mélange des éléments traces (Figure V.4). Cette souche (T3.2) a présenté un profil différent de celui de la souche T2, avec une absence de croissance à 0,5T. Ceci a montré une sensibilité élevée à ce niveau. Sa croissance augmente avec la concentration des ETM du sol de Tamra, pour ensuite diminuer à la concentration de 2T.

Par ailleurs, aucune différence significative selon le test LSD ($p < 0,05$) pour les μ mesurés, des isolats T7 et T9.2 n'a été enregistrée dans le milieu LB liquide (sans éléments traces) (Figure V.4). Cependant, leur réponse varie dans les milieux contaminés testés (0,5T, 1T et 2T). L'isolat T7 a montré un comportement similaire à celui de T2 et T3.2. Sa croissance était diminuée à 0,5T par rapport au milieu LB, puis elle s'est améliorée significativement à 1T. En outre, une diminution de μ a été enregistrée dans le milieu 2T. Par contre, la souche T9.2 a présenté une stratégie distincte. Elle avait un taux de croissance significativement plus élevé à 0,5T par rapport à celui du milieu LB, suggérant son adaptation à ces conditions. Ensuite, sa croissance se trouvait diminuer significativement à la concentration 1T par rapport aux autres isolats (T2, T3.2 et T7). Par ailleurs, à la forte concentration testée (2T), pour la souche T9.2, μ a augmenté considérablement par rapport à T3.2 et T7. Parmi les 4 souches, T9.2 est particulièrement intéressante considérant sa forte tolérance aux éléments traces étudiés, dans les conditions de mesure.

La sélection des souches destinées aux futures études de bioremédiation des sols miniers de Tamra nécessite une étude complémentaire pour examiner leur rôle sur la plante.

3.2. Traits PGPR chez les 4 souches bactériennes isolées et sélectionnées du sol minier de Tamra

La capacité des isolats à promouvoir la croissance des plantes a été évaluée par la mesure de quatre traits clés : fixation de l'azote, production d'ammonium, solubilisation des phosphates et synthèse d'acide indole acétique (AIA).

3.2.1. Fixation de l'azote

L'azote (N) est un élément nutritif vital pour tous les organismes vivants. Les bactéries fixatrices d'azote constituent l'un des principaux mécanismes par lesquels les plantes

bénéficient de l'association microbienne (Mahmud *et al.*, 2020). La capacité des quatre souches testées à fixer l'azote a été déterminée en utilisant le milieu Winogradsky. Après 48 heures d'incubation, toutes les souches se développent sur ce milieu, ce qui indique que le test est positif. Ainsi, un examen visuel de la croissance des différentes souches testées a été effectué afin d'évaluer qualitativement leur potentiel de fixation de l'azote. La souche T2 a montré une croissance nettement plus abondante sur le milieu Winogradsky suggérant une forte capacité de fixation de l'azote. En revanche, les souches T7, T3.2 et T9.2 ont présenté des croissances limitées traduisant une efficacité de fixation faible à moyenne (Figure V.5).

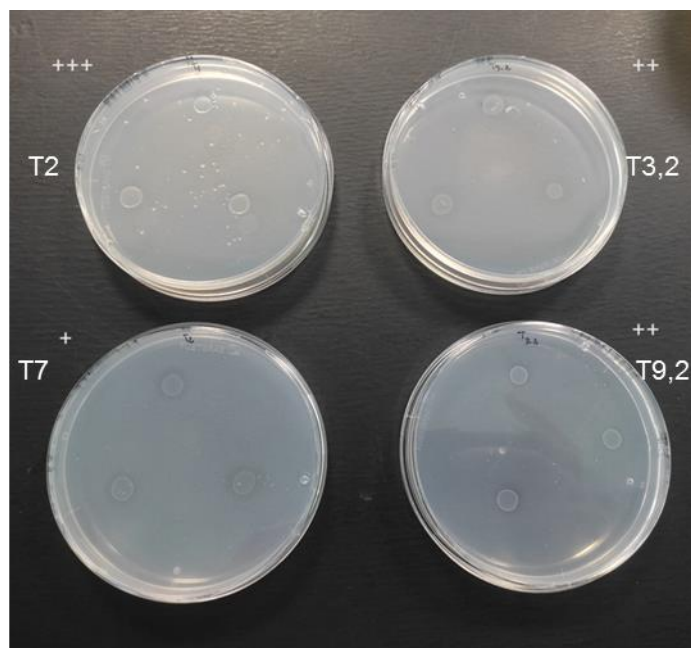


Figure V. 5. Capacité des souches testées (T2, T3.2, T7 et T9.2) à fixer l'azote après 48 heures d'incubation sur le milieu NFb (Nitrogen Free broth) : +++ : forte fixation ; ++ : moyenne ; + : faible fixation.

3.2.2. Production de NH_4^+

La production d'ammonium est un des principaux traits PGPR. Il permet de couvrir les besoins de la plante en azote (Vocciante *et al.*, 2022). En outre, elle peut influencer les réactions de défense des plantes par la régulation du métabolisme primaire lors des interactions entre la plante et les agents pathogènes (Wang *et al.*, 2019). La production d'ammonium (NH_4^+) a été déterminée selon la méthode de Berthelot. Les résultats montrent que la production de NH_4^+ a été observée chez les souches T3.2 et T9.2, avec des concentrations qui varient

considérablement entre 26,8 et 106,8 nmol. L⁻¹, respectivement. Cependant, elle n'a pas été détectée chez les souches T2 et T7 (Figure V.6).

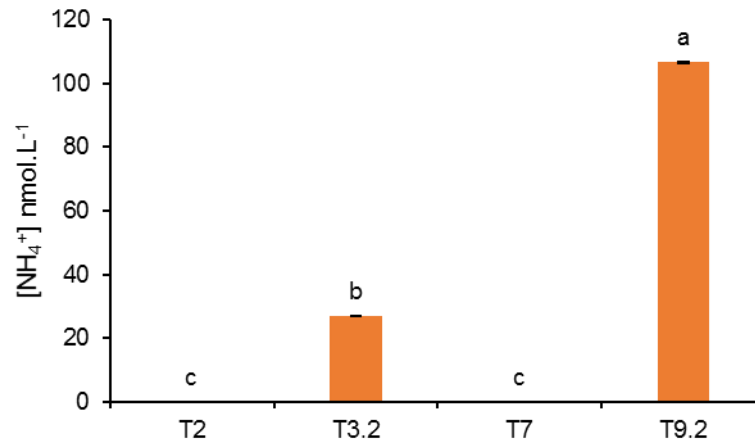


Figure V. 6. Production d'ammonium (NH₄⁺, nmol. L⁻¹) par les souches testées (T2, T3.2, T7 et T9.2) après 48 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne ± écart type (n=3). Les lettres indiquent une différence significative selon le test LSD (p < 0,05).

3.2.3. Solubilisation du phosphate

Les quatre souches bactériennes testées ont été étalées sur le milieu de culture de Pikovskaya (PVK) contenant du phosphate tricalcique (Ca₃(PO₄)₂) comme source de phosphate. Après 24 heures d'incubation, deux isolats (T2 et T9.2) ont présenté un halo autour de la colonie (Figure V.7).

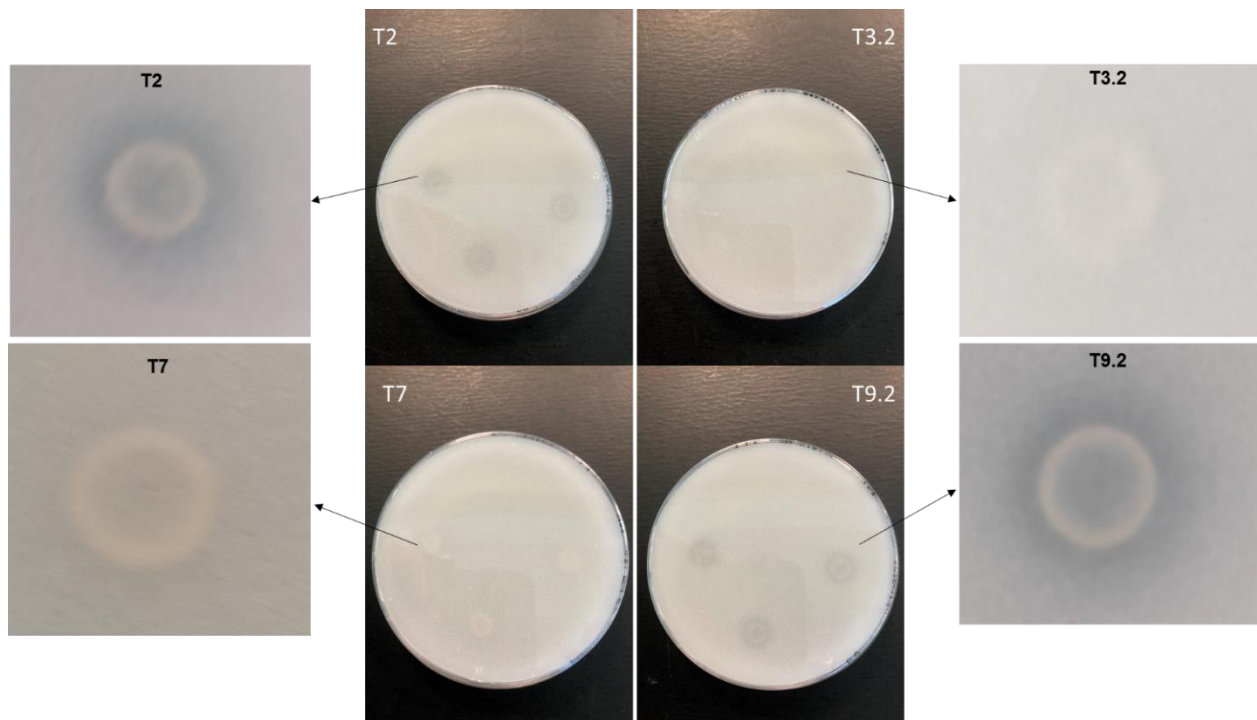


Figure V. 7. Solubilisation du phosphate par les isolats bactériens testés (T2, T3.2, T7 et T9.2) après 24 heures d'incubation à 30°C sur une gélose de Pikovskaya (PVK).

Par ailleurs, les indices de solubilisation du phosphate (ISP) ont montré une forte solubilité chez T2 (PSI = 3,16) alors que celle-ci était modérée chez T9.2 (PSI = 2,57).

3.2.4. Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production d'acide indole acétique (AIA) par les bactéries est l'une des caractéristiques notables des PGPR. La capacité des quatre souches testées à produire de l'AIA a été évaluée en mesurant l'apparition d'une couleur rose après avoir ajouté le réactif de Salkowski à la culture. Cette coloration correspond à la formation d'un complexe entre AIA produit par les souches testées et le réactif (mélange d'acide perchlorique et de chlorure ferrique). Trois souches ont produit des quantités d'auxine significativement variables, allant de 0,04 à 0,07 $\mu\text{g/ml}$ (Figure V.8). Le taux le plus élevé a été détecté chez la souche T7, tandis que le plus faible a été enregistré chez la souche T2. Cependant, il n'y a pas eu d'AIA détectée chez la souche T3.2.

Chapitre V. Identification et caractérisation des souches bactériennes indigènes du site minier de Tamra

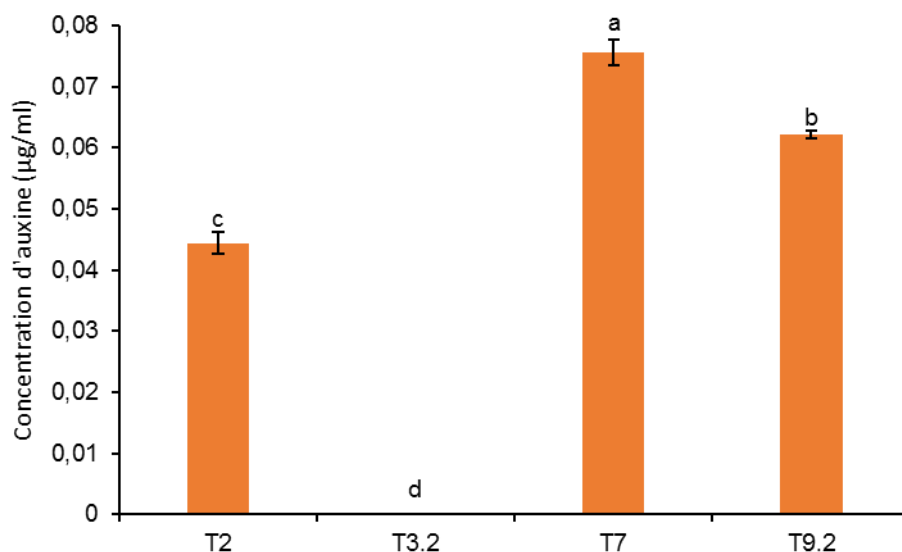


Figure V. 8. Concentration (µg/ml) d'auxine produite par les 4 souches testées après 24 heures d'incubation. Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne $\pm$ écart type (n=3). Les lettres indiquent une différence significative selon le test LSD ($p < 0,05$).

Cette étude a montré une variabilité entre les souches testées (Tableau V.2). Parmi les quatre, une seule souche (T9.2) présentait tous les différents traits étudiés, révélant son potentiel intéressant pour favoriser la croissance des plantes. Cependant, l'isolat T2 présentait trois traits caractéristiques, mais il était inapte à produire du NH_4^+ , tandis que les souches T7 et T3.2 n'exprimaient que deux traits, ce qui suggère une complémentarité fonctionnelle potentielle entre ces isolats.

Tableau V. 2. Récapitulatif des principaux traits PGPR pour les 4 souches sélectionnées (T2, T3.2, T7 et T9.2) : +++ : Production forte ; ++ : production modérée ; + : production faible ; - : absence de production.

Souches	Solubilisation du phosphate	Production d'IAA	Fixation de l'azote	Production de NH_3
T2	+++	+	+	-
T3.2	-	-	++	+
T7	-	+++	+++	-
T9.2	++	++	++	++

3. 3. Identification moléculaire des souches

L'identification moléculaire a été réalisée par amplification du gène 16S rRNA à l'aide des amorces universelles 16S-27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 16S-1492r (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') (Marchesi et al., 1998). Le séquençage a permis d'assigner des noms de genre aux quatre isolats testés en se basant sur une analyse BLAST. Ainsi, le genre bactérien qui montre plus 99% d'identité avec la séquence soumise est considéré comme le genre le plus probable pour la souche isolée.

Les résultats ont montré que les souches T2 et T7 appartiennent au genre *Agrobacterium*, alors que les souches T3.2 et T9.2 aux genres *Paenibacillus* et *Pseudomonas sp* (souche *Irchel*) respectivement (Tableau V.3). Ces trois genres sont bien connus pour leur tolérance potentielle aux éléments toxiques et leurs aptitudes PGPR (Fakhar *et al.*, 2020; Kanekar & Kanekar, 2022)

Tableau V. 3. Identification moléculaire des souches bactériennes basée sur le séquençage

Codes de la souche	Genres
T2	<i>Agrobacterium</i>
T3.2	<i>(paeni) Bacillus</i>
T7	<i>Agrobacterium</i>
T9.2	<i>Pseudomonas sp (souche irchel)</i>

3.4 . Effet combiné de la souche T9.2 (*Pseudomonas sp irchel*) et d'un extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus* sur la germination de *Casuarina glauca*

La souche isolée *Pseudomonas sp irchel* a prouvé sa grande tolérance aux éléments traces étudiés et sa capacité à promouvoir la croissance des plantes (Tableau V.2, Figure V.4). Afin d'évaluer la capacité de cette souche à améliorer la germination et la croissance de la plante hôte (*C. glauca*), un test de bioaugmentation a été mené en associant cette souche et un extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus* (BEu) sur la germination de *C. glauca*. Il a été réalisé sous condition contrôlée et en absence d'ETM. Après culture de la souche, les cellules ont été soigneusement lavées avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer tout résidu du milieu nutritif avant d'être utilisées comme inoculum. Cette étude permet d'évaluer l'effet synergique attendu entre la souche sélectionnée et le BEu, notamment en termes d'amélioration du pourcentage et de la vitesse de germination, de la vigueur et de la biomasse des plantules.

Les résultats montrent qu'aucune différence significative sur tous les paramètres mesurés n'a été enregistrée pour les conditions suivantes : les graines de *C. glauca* germées dans l'extrait aqueux de BEu, et celles en contact avec la souche et celles de contrôle (eau distillée) (Figure V.9). Ces observations relèvent que ces conditions (extrait du biochar et souche) n'ont pas d'effet inhibiteur sur la germination de *C. glauca*. A l'inverse, l'association de BEu et de *Pseudomonas sp irchel* a montré un effet synergique clairement observé sur tous les paramètres mesurés. En effet, cette association a considérablement amélioré la biomasse fraîche des plantules (Figure V.9a). Elle a stimulé également la longueur des racicules (LR, Figure V.9b) et amélioré la moyenne journalière de germination (GMD, Figure V.9c). Par ailleurs, elle permet d'augmenter significativement le pourcentage de germination et l'indice de vigueur des graines (SVI) par rapport aux différents traitements testés (Figure V.9d). Ces résultats suggèrent que l'interaction biochar-bactérie pourrait optimiser plusieurs étapes du développement précoce de *C. glauca* et renforcer le potentiel de phytostabilisation assistée.

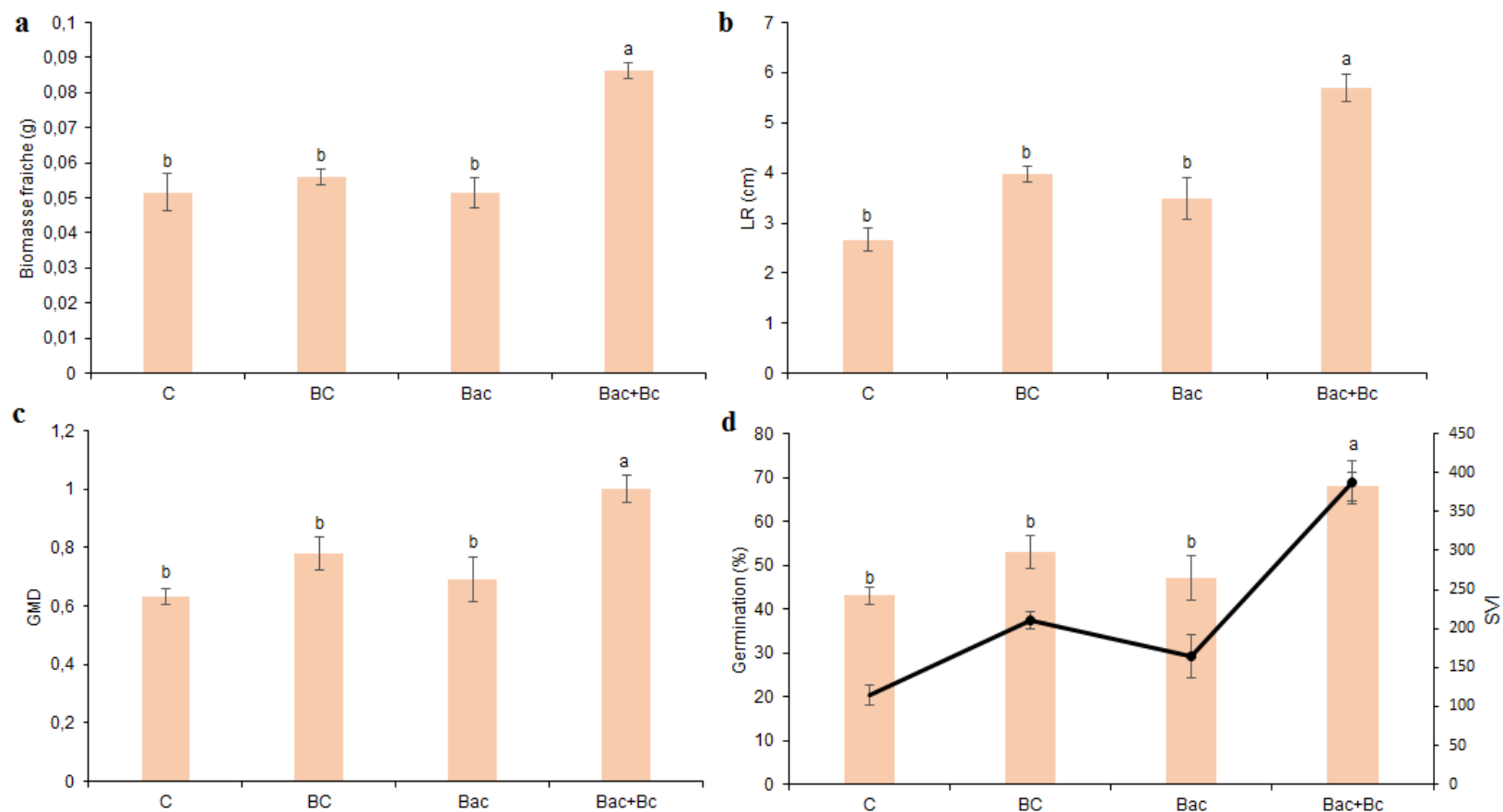


Figure V. 9. Résultats de test de bioaugmentation avec les graines endémiques de *Casuarina glauca* après 17 jours de germination : **a)** Biomasse fraîche (g) ; **b)** longueur des radicules (LR ; cm) ; **c)** moyenne journalière de germination (Germination Daily Mean ; GMD) ; **d)** pourcentage de germination et indice de vigueur des graines (SVI) : C: contrôle (eau distillée), BC: extrait de biochar d'Eucalyptus, Bac: *Pseudomonas* sp irchel + H₂O, Bac+Bc: culot bactérien + extrait de biochar. Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne $\pm$ l'écart type (n=4). Les lettres indiquent une différence significative selon le test LSD ($p < 0,05$).

4. Discussion

La mine de fer de Tamra se distingue par la complexité de sa géologie et par ses ressources hydriques abondantes (Decrée *et al.*, 2010). Ces conditions environnementales favorisent la diversité des habitats, la présence d'une biodiversité riche et une grande variété minérale. Toutefois, la présence des éléments traces toxiques affecte non seulement la fertilité des sols mais également la communauté microbienne (Song *et al.*, 2021; Dahnoun *et al.*, 2024). Ainsi, les bactéries sensibles pourraient être moins abondantes et moins diversifiées tandis que celles résistantes pourraient s'adapter facilement aux conditions locales contrairement aux souches exogènes (Dahnoun *et al.*, 2024). Ces bactéries peuvent être exploitées seules ou en association avec des plantes et / ou des amendements pour la réhabilitation des sites contaminés.

Dans ce contexte, cette étude a permis de mieux comprendre le comportement des souches bactériennes isolées des sols miniers de Tamra en mettant en évidence à la fois leur tolérance aux ETM étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As), et leurs propriétés PGPR afin d'évaluer l'effet de la souche la plus performante sur la germination des graines de *C. glauca*. Cette approche permet également d'élucider les interactions potentielles entre la souche bactérienne sélectionnée, le biochar d'*Eucalyptus* et les graines de *C. glauca*.

Treize souches bactériennes ont été isolées à partir de sols miniers prélevés sur le site de Tamra, ensuite évaluées pour leur tolérance aux ETM prédominants dans ce site (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As). Les résultats obtenus confirment la présence de six souches bactériennes ayant une tolérance aux éléments examinés en milieu liquide (Tableau V.1 et Figure V.2). Par ailleurs, en milieu solide, les seuils de tolérance enregistrés variaient en fonction de l'élément : Fe (500 mg. L⁻¹), Mn (300 mg. L⁻¹), Zn (100 mg. L⁻¹), Pb et As (50 mg. L⁻¹), et Cd (10 mg. L⁻¹), confirmant la forte pression sélective exercée. Au final, quatre souches (T2, T3.2, T7 et T9.2) ont été sélectionnées pour leur résistance combinée et testées ensuite dans des mélanges des éléments étudiés correspondant aux concentrations extractibles au sol de Tamra à l'aide de CaCl₂ (Figure V.3b). Parmi elles, seule la souche T9.2 a maintenu une croissance significativement plus élevée à la concentration la plus forte (2T (Fe (578,08 mg. L⁻¹), Zn (993,4 mg. L⁻¹), Mn (763,54 mg. L⁻¹), Pb (0,74 mg. L⁻¹), Cd (1,92 mg. L⁻¹), As (102,1 mg. L⁻¹)). Cette observation a souligné son potentiel d'adaptation face à la combinaison complexe des éléments examinés. Cependant,

des études complémentaires sur sa résistance en conditions réelles seraient nécessaires pour confirmer les résultats obtenus.

L'évaluation de divers traits PGPR a révélé une variabilité significative dans les capacités fonctionnelles des souches bactériennes testées. Parmi les quatre souches, seule T9.2 exprimait tous les traits étudiés (fixation de l'azote, production d'ammonium, solubilisation du phosphate, production d'auxine) (Tableau V.2), ce qui en fait un candidat de choix pour favoriser la croissance des plantes. En outre, l'identification moléculaire a permis de rattacher les souches T2 et T7 au genre *Agrobacterium*, la souche T3.2 au genre *Paenibacillus* et la souche T9.2 au genre *Pseudomonas sp.* (souche *Irchel*) (Tableau V.3). Enfin, l'application combinée de la souche *Pseudomonas sp. Irchel* (T9.2) et de l'extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus* a significativement amélioré le taux de germination des graines de *C. glauca* (Figure V.9).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus mettent en évidence une variabilité significative selon le test LSD ($p < 0,05$) entre les souches bactériennes isolées dans la tolérance aux ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) des sols miniers de Tamra. Cette hétérogénéité inter-souches relève de la diversité des mécanismes d'adaptation potentiels.

4.1. Mécanismes de détoxification des ETM

Les isolats bactériens exposés au stress imposé par les ETM en excès déploient différentes stratégies de tolérance. Toutes les souches testées ont montré une croissance notable à la concentration de 500 mg. L⁻¹ de Fe, en particulier les souches T3.1 et T3.2 (Figure V.2a). Cette tolérance élevée signalée chez les souches isolées peut être attribuée à une adaptation progressive dans un environnement contraignant riche en fer. Des études similaires menées sur la tolérance des bactéries aux environnements riches en fer ont démontré la capacité de certains isolats à survivre dans des milieux fortement pollués par le Fe. Hsu *et al.* (2024) ont révélé que la souche *Metallucola ferriviriculae*, isolée d'une mine souterraine de fer au Canada, a été identifiée pour son adaptation spécifique aux milieux riches en fer. Par ailleurs, la souche *Acidithiobacillus ferriphilus*, isolée du drainage minier acide, a montré son potentiel à réduire et à oxyder le Fe(II) dans des environnements alcalins riches en fer (Zavarzina *et al.*, 2023). Elle possède également des mécanismes de détoxification de Fe. Ces bactéries, similaires à celles isolées dans notre étude, en particulier T3.1 et T3.2, semblent développer des stratégies

évolutives pour gérer les contraintes liées à l'excès de ce métal. Ces observations pourraient également être liées au développement de certains mécanismes physiologiques : (1) d'absorption qui limitent l'accumulation de Fe lorsque la concentration intracellulaire est élevée (Sun *et al.*, 2024), (2) de séquestration intracellulaire du Fe où les protéines de stockage telles que les ferritines et les bactérioferritines le maintiennent sous une forme moins toxique (Oleńska *et al.*, 2025), (3) de la réaction de Fenton, catalysée par un excès de fer, qui génère des radicaux hydroxyles (Sui *et al.*, 2024), et (4) de la sécrétion d'exopolysaccharides (EPS) favorise la rétention des ions Fe hors de la cellule bactérienne (Nnaji *et al.*, 2024). De même, la tolérance marquée de la souche T7 à des concentrations avoisinantes de 500 mg. L⁻¹ de Zn en milieu liquide (Figure V.2b) pourrait être attribuée à des systèmes d'efflux actif *via* des pompes membranaires ainsi que des transformations chimiques efficaces tels que la complexation réduisant la toxicité des ETM (Nnaji *et al.*, 2024). En outre, la production d'EPS et de biofilms par les bactéries pourraient limiter l'absorption des éléments traces (Nnaji *et al.*, 2024; Oleńska *et al.*, 2025). Ces mécanismes semblent également actifs pour le Pb et l'As (50 mg. L⁻¹) dans les deux milieux (liquide et solide) testés (Tableau V.1 et Figure V.3b). En revanche, la sensibilité enregistrée vis-à-vis du Cd pour toutes les souches testées (tolérance limitée à 10 mg. L⁻¹ en milieu solide) (Figure V.3b) pourrait être liée à la forte toxicité de ce métal. En effet, le Cd présente une forte affinité pour les groupes thiols, entraînant des dommages aux protéines, et par contre lesquels les mécanismes de défense peuvent s'avérer peu efficaces (Goncharuk & Zagorskina, 2023; Oleńska *et al.*, 2025).

4.2. Spécificité métal-isolat

Les isolats bactériens présentent une sensibilité différente aux ETM. Ils peuvent avoir une tolérance accrue à un métal mais y sont sensibles à un autre comme le montrent les résultats obtenus (Tableau V.1 et Figure V.2 ; 5.3). Ces observations reposent sur des différences génétiques et physiologiques des isolats. L'identification moléculaire a montré que les souches testées appartiennent aux genres *Agrobacterium* (T2 et T7), *Paenibacillus* (T3.2) et *Pseudomonas sp. Irchel* (T9.2) (Tableau V.3). Cette identification est en accord avec des recherches antérieures qui indiquent que ces genres peuvent présenter des profils de tolérance distincts et des caractéristiques PGPR variées. Ainsi, Dahnoun *et al.* (2024) ont montré que les souches *Pseudomonas* et *Bacillus* sont très résistantes au Cd avec des concentrations minimales

inhibitrices pouvant atteindre 1400 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$. En outre, *Paenibacillus* présente une tolérance élevée au Cu (750 mg. L^{-1}), au Zn (500 mg. L^{-1}) et à l'As (400 mg. L^{-1}) (Govarathanan *et al.*, 2016). De même, Sridevi & Raghuram (2019) ont montré que la tolérance des *Paenibacillus* aux Cu, Zn et Pb pouvait atteindre 500 mg. L^{-1} . Par ailleurs, Harun *et al.*, (2024) ont mis en évidence sa résistance à des concentrations de Pb pouvant atteindre 3000 mg. L^{-1} . *Pseudomonas sp.* a démontré des capacités exceptionnelles de tolérance au Pb (15 mM), à As (20 mM), et au Zn (30 mM) grâce à des gènes de résistance retrouvés sur des plasmides (Shafique *et al.*, 2017). Ces gènes tels que *copA*, *copB*, et *czcA* sont considérés comme responsables de la résistance aux ETM chez *Pseudomonas sp.*, améliorant leur survie dans les milieux contaminés (Al-Sajad & Alsalim, 2024). *Pseudomonas sp.* présente également la capacité de biotransformation de l'As, réduisant l'As (V) et oxydant l'As (III) (Shafique *et al.*, 2017). En outre, Liu *et al.* (2024) ont également montré qu'*Agrobacterium* est capable de biosorber efficacement les ETM à partir de solutions aqueuses contaminées, avec une capacité d'adsorption maximale de 234 mg/g pour le Pb, 58 mg/g pour le Cd et 51 mg/g pour le Zn. La capacité de cette souche à l'adsorption des Pb, Cd et Zn est due à l'échange d'ions et à la complexation avec des groupes fonctionnels à la surface de la bactérie (Liu *et al.*, 2024).

Bien que la spécificité métal-isolat soit un facteur essentiel dans les processus biochimiques, l'évaluation de la tolérance des isolats aux multi-métaux permet de mieux comprendre les interactions qui influencent la réponse des souches dans un contexte plus complexe.

4.3. Tolérance multi-métaux et effets d'interaction

La tolérance bactérienne à un mélange des métaux dépend de la souche et des interactions entre métaux. En effet, les métaux peuvent interagir de manière additive, synergique ou antagoniste, notamment du fait de compétitions sur les sites de liaison et/ou l'induction croisée des systèmes de défense (Sönmez *et al.*, 2025). Les résultats des tests réalisés sur les mélanges d'éléments traces ont démontré que seule *Pseudomonas sp. (irchel)* maintenait une vitesse de croissance spécifique (μ , h^{-1}) significativement plus élevée à la moitié (0,5T) et au double de la concentration extractible des ETM mesurée dans le sol de Tamra (2T) selon le test LSD ($p < 0,05$) (Figure V.4). Ceci pourrait s'expliquer par sa capacité d'adaptation ainsi que par l'effet de protections reposant sur la production de sidérophores lesquels jouent un rôle essentiel dans la liaison et le transport des polluants en réduisant leur toxicité (Meesungnoen *et al.*, 2021).

L'existence probable de multiples mécanismes (systèmes d'efflux, biosorption et production enzymatique) développés par cette souche bactérienne pourrait expliquer son efficacité contre le mélange des métaux (Nnaji *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2024). Le comportement non linéaire observé (Figure V.4) chez *Pseudomonas sp.* (souche *irchel*) (tolérance marquée constatée à 0,5T, suivie d'une importante inhibition à la concentration extractible mesurée dans les sols miniers de Tamra, puis d'une reprise de la croissance à la concentration la plus élevée (2T) pourrait s'expliquer par (1) à la faible concentration en ETM, l'induction de mécanismes de résistance tels que l'activation de pompes d'efflux ou la production de chélateurs, permettant de limiter l'accumulation intracellulaire d'ions métalliques (Al-Sajad & Alsalim, 2024 ; Nnaji *et al.*, 2024) et (2) à la concentration réelle mesurée dans le sol (1T), la saturation de ces mécanismes entraînant ainsi une inhibition (Varela *et al.*, 2023). Cependant, à la forte concentration testée du mélange, certains éléments deviennent moins biodisponibles en raison de phénomènes possibles de précipitation ou de complexation, ce qui réduit paradoxalement leur toxicité apparente (Thorgersen *et al.*, 2023). Contrairement aux résultats obtenus par Appanna *et al.* (1996), qui ont montré la diminution de la croissance de *Pseudomonas* dans un milieu multi-métaux (Mn, Co, Cs et Ni). Cette différence pourrait être attribuée à divers facteurs, notamment la différence des milieux d'isolement, les mécanismes génétiques de la souche, sa sensibilité ou sa tolérance à un mélange multi-métaux particulier, sa capacité à gérer les métaux en question ainsi que les interactions entre les métaux eux-mêmes.

Bien que cette étude a montré la tolérance remarquable de la souche *Pseudomonas sp.* (souche *irchel*), des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer son potentiel dans les conditions réelles.

4.4. Liens entre les caractéristiques PGPR et la tolérance aux éléments traces testés

Les résultats obtenus ont montré que la tolérance des isolats aux éléments étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) peut être liée à leurs caractéristiques PGPR, ce qui reflète un équilibre entre l'adaptation au stress causé par les ETM et les fonctions de promotion de la croissance des plantes. Plusieurs études ont montré que certaines bactéries isolées des sols contaminés développent des mécanismes de résistance aux ETM, pouvant coexister avec des traits bénéfiques pour les plantes (Joshi *et al.*, 2023 ; Iimaa *et al.*, 2025). Les quatre souches sélectionnées ont présenté une tolérance contrastée aux éléments étudiés (Figure V.2 ; 5.3), tout

en montrant certaines caractéristiques PGPR. La souche T2 du genre *Agrobacterium*, fortement fixatrice d'azote (Figure V.5), permettrait de compenser les stress nutritionnels dans les milieux contaminés (Mahmud *et al.*, 2020), tandis que la souche T7 de même genre (*Agrobacterium*), qui tolère des concentrations élevées de Zn (Figure V.2b) et synthétise des auxines (Figure V.8), contribuerait à stimuler directement la croissance des racines (Kunkel & Harper, 2018 ; Vocciante *et al.*, 2022). Cependant, certaines divergences constatées pourraient refléter des arbitrages potentiels (Tableau V.2). En effet, la production d'ammonium limitée pour deux souches (T3.2 et T9.2) (Figure V.6) pourrait être liée à des dépenses énergétiques différenciées en conditions de stress liées aux ETM, réduisant ainsi la disponibilité des ressources métaboliques pour d'autres fonctions PGPR. Certaines souches bactériennes peuvent rediriger l'énergie vers des mécanismes de survie plutôt que vers la production de NH_4^+ (Banach *et al.*, 2021). Par ailleurs, la variabilité enregistrée au niveau de la solubilisation du phosphate et de la sécrétion d'auxine (Tableau V.2) pourrait refléter une spécialisation métabolique en fonction des pressions sélectives rencontrées dans les milieux contaminés (Vocciante *et al.*, 2022). Dans l'ensemble, ces deux caractéristiques (tolérance aux ETM et trait PGPR) peuvent interagir de manière complémentaire pour favoriser la résistance et la croissance des plantes dans des environnements fortement contaminés.

4.5. Effet combiné de *Pseudomonas sp. irchel* et de l'extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus* sur la germination de *Casuarina glauca*

Les résultats observés ont montré que la combinaison de l'extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus* (BEu) et de *Pseudomonas sp.* (souche *irchel*) exerce un effet synergique significatif sur la germination et la croissance initiale de *C. glauca* (Figure V.10). Ces observations concordent avec celles de plusieurs études démontrant que l'association de PGPR et d'amendements organiques améliore la croissance des plantes (Anwar *et al.*, 2021; Shilpa *et al.*, 2024). Elles peuvent être expliquées par plusieurs mécanismes plausibles. En effet, l'extrait de biochar contient des composés organiques et minéraux solubles tels que des acides humiques, des phénols et des cations échangeables connus pour améliorer la disponibilité des nutriments (Lou *et al.*, 2016 ; Kumar *et al.*, 2021). Ces composés pourraient améliorer l'activation des processus biologiques au niveau des graines, en favorisant le développement

racinaire et l'absorption des nutriments essentiels tels que l'azote et le phosphore (Lou *et al.*, 2016 ; Kumar *et al.*, 2021). De plus, il permet également de réguler le pH du milieu de germination, favorisant ainsi un milieu plus propice à la croissance des racines et à l'activité microbienne bénéfique (Ma *et al.*, 2022). En outre, il contribue à l'imbibition des graines, améliorant leur rétention d'eau et favorisant un taux d'humidité optimal autour des semences. Ceci pourrait diminuer les effets de la sécheresse, limitant ainsi le stress osmotique (Ma *et al.*, 2022). L'ensemble de ses caractéristiques peuvent faciliter la germination des graines testées. Par ailleurs, la souche *Pseudomonas sp. irchel* très tolérante aux éléments traces (Figure V.4) et exprimant certains traits PGPR (production d'auxine, fixation de l'azote, production de NH_4^+ , solubilisation des phosphates) (Tableau V.2), permet de réguler la signalisation hormonale (Fakhar *et al.*, 2020 ; Oliveira *et al.*, 2024). La production d'auxine (Figure V.8), en particulier, est un facteur déterminant dans l'induction du développement de la partie racinaire (Vocciante *et al.*, 2022). L'effet combiné de BEu et de *Pseudomonas sp. Irchel* repose par conséquent sur une synergie fonctionnelle. Le biochar apporte des composés solubles améliorant la biodisponibilité des nutriments, tandis que la souche bactérienne optimise la physiologie de la germination par les métabolites secondaires qu'elle produit et ses fonctions nutritionnelles. Ces mécanismes sont cohérents avec plusieurs études qui montrent que l'interaction biochar-PGPR peut améliorer à la fois la vigueur des semis et le développement des plantes en phase précoce, même en conditions non contaminées (Kumar *et al.*, 2021; Heydari *et al.*, 2023; Zou *et al.*, 2024).

Les résultats obtenus suggèrent que l'association biochar d'*Eucalyptus* – PGPR, en particulier avec la souche *Pseudomonas sp.*, constitue une approche prometteuse pour améliorer la germination de *C. glauca*, ouvrant ainsi de nouvelles opportunités pour la phytostabilisation assistée des sols miniers de Tamra. Bien que cette approche soit préliminaire, elle donne des résultats encourageants. Elle présente toutefois certaines limites qu'il convient de mentionner. En effet, l'essai de germination a été réalisé dans des conditions artificielles, dans des boîtes de pétri et en l'absence des éléments traces présents dans les sols miniers de Tamra, ce qui limite l'extrapolation directe aux conditions réelles.

5. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de sélectionner quatre souches bactériennes, isolées parmi treize, caractérisées par une tolérance marquée aux éléments traces (Fe, Zn, Mn, Cd, Pb et As). Parmi lesquelles *Pseudomonas sp. (Irchel)*, qui présente les meilleures performances en conditions multi-métalliques. L'analyse de leurs traits PGPR a révélé des potentiels variables, en particulier la fixation de l'azote, la solubilisation des phosphates, la production d'auxine et d'ammonium. Enfin, le test de germination des graines de *C. glauca* dans des conditions contrôlées a permis de démontrer que l'inoculation avec *Pseudomonas sp. (Irchel)* amendée avec un extrait de biochar d'*Eucalyptus* a stimulé significativement la germination et la croissance des plantules. Nos résultats ont signalé que l'application d'une approche combinée bio-inoculant-biochar serait un outil prometteur pour le reboisement des sites miniers ferrifères contaminés. Toutefois, des études complémentaires seront nécessaires, en particulier une analyse plus approfondie des souches pour renforcer la validité des résultats. Ainsi, une vérification taxonomique par le séquençage d'autres loci permettrait d'identifier les espèces des isolats, ainsi qu'une validation fonctionnelle par des tests enzymatiques ou métabolomiques permettraient de mieux caractériser le potentiel réel des quatre isolats sélectionnés. Par ailleurs, une analyse physicochimique approfondie de l'extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus* utilisé apporterait des informations clés sur les mécanismes impliqués dans la stimulation observée de la germination. De plus, des expériences en microcosme (tests en pots) avec les sols miniers de Tamra seraient une étape essentielle pour évaluer l'efficacité de la souche testée (*Pseudomonas sp. (Irchel)*) et son association avec le BEu dans des conditions plus proches de la réalité, en tenant compte de la présence et la biodisponibilité effective des éléments étudiés (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As). À long terme, ces résultats préliminaires ouvrent la voie à des essais *in situ*. La transposition donc de ces acquis aux conditions de terrain nécessitera non seulement une validation écologique, mais également une évaluation environnementale de la durabilité du procédé. Ces essais permettront de confirmer que la combinaison *Pseudomonas sp. (Irchel)*-BEu peut représenter une stratégie de phytostabilisation efficace et moins coûteuse et de surcroît applicable non seulement sur le site minier de Tamra mais également sur d'autres sites miniers similaires.

Discussion générale

1. Introduction

La mine de fer à ciel ouvert de Tamra, située au nord-ouest de la Tunisie, constitue la dernière exploitation minière active du pays. Son activité engendre une forte contamination environnementale en raison d'importants volumes de déchets solides (stériles, résidus) et d'émissions particulières, qui ne sont pas gérés correctement. Cette exploitation favorise une accumulation d'ETM dont le Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As dans les sols environnants. Par ailleurs, le climat méditerranéen de la zone d'étude accentue la dispersion des polluants ; en effet, durant les périodes sèches, le vent peut transporter les particules fines, entraînant la contamination des zones voisines. Tandis que les fortes pluies pendant les périodes hivernales peuvent transférer les ETM *via* le ruissellement vers les écosystèmes agricoles et hydriques. Cependant, certains processus géochimiques naturels permettent d'atténuer cette pollution, notamment la néoformation de minéraux secondaires capables d'immobiliser les éléments traces ce qui réduit leur biodisponibilité (Mlayah *et al.*, 2013; Sahraoui *et al.*, 2015).

La présence de ces polluants métalliques soulève plusieurs enjeux :

i) **Enjeux environnementaux** : cette contamination altère profondément les propriétés physico-chimiques des sols, perturbe les cycles biogéochimiques et entraîne une diminution significative de leur fertilité. Par ailleurs, la mobilité des ETM favorise leur transfert vers les eaux de surface et les nappes souterraines, compromettant ainsi la qualité des ressources hydriques locales et accentuant leur dispersion dans l'environnement. Cette contamination peut également affecter la biodiversité, tant au niveau des écosystèmes aquatiques que terrestres. La biodiversité du sol et leurs activités enzymatiques peuvent être considérablement inhibées, ce qui limite les fonctions enzymatiques essentielles. Ces conditions contraignantes ont réduit considérablement la diversité végétale en faveur des espèces métallotolérantes ;

ii) **Enjeux sanitaires** : la spéciation de ces métaux, déterminant leur mobilité et leur biodisponibilité, conditionne leur transfert potentiel vers les eaux de surface, les nappes phréatiques ainsi que la chaîne trophique. Ce processus augmente l'exposition des populations locales, notamment les enfants, par ingestion, inhalation et contact cutané. L'exposition chronique à ces éléments traces, même à faibles doses, peut induire des effets toxiques sévères représentant ainsi un enjeu majeur de santé publique (Islam *et al.*, 2023; Bjørklund *et al.*, 2025). Par ailleurs, la persistance de ces ETM, leur mobilité dépendante des conditions pédogéochimiques et leur fort potentiel de bioaccumulation compliquent leur gestion et

Discussion générale

soulignent la nécessité de stratégies durables de suivi, de prévention et de remédiation. Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse est de caractériser le comportement et la spéciation des éléments traces (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans les sols miniers du site de Tamra et d'évaluer la faisabilité d'une stratégie de phytoremédiation assistée reposant sur l'utilisation de l'espèce ligneuse *Casuarina glauca*, de l'actinobactérie *Frankia* et d'un biochar produit à partir de biomasse d'*Eucalyptus*. L'étude vise également à examiner le rôle potentiel de la microflore bactérienne indigène dans les processus de stabilisation ou de mobilisation des métaux. L'enjeu est de développer des approches intégrées de gestion durable des sols miniers contaminés. Les recherches visent ainsi à répondre aux questions scientifiques suivantes :

1. Comment les caractéristiques physico-chimiques du sol et la composition minéralogique influencent-elles la distribution et la spéciation latérale (amont, milieu, et aval) et verticale des ETM ? Et quels sont les facteurs clés qui contrôlent leur biodisponibilité ?
2. Dans quelle mesure la contamination des sols et des eaux du site minier de Tamra expose-t-elle les populations locales et les écosystèmes à des risques sanitaires et environnementaux ?
3. L'amendement du sol minier par le biochar d'*Eucalyptus* améliore-t-il la croissance, la tolérance, la capacité d'accumulation de *C. glauca* et son efficacité en phytoremédiation des sols contaminés par les ETM ?
4. L'inoculation de graines de *C. glauca* endémiques par une souche bactérienne autochtone issue du sol minier en présence d'un extrait de biochar, comparée à des graines non inoculées et/ou sans biochar, améliore-t-elle le taux de germination et le développement des plantules en absence de contamination ?

Afin de répondre à ces questions, une approche multidisciplinaire a été adoptée (Figure 1), articulée autour des objectifs spécifiques suivants :

- (1) Caractériser la contamination du site par les ETM en évaluant la spéciation latérale et verticale des ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) dans les sols miniers de Tamra ;
- (2) Tester l'efficacité du couplage *C. glauca* - *Frankia* - biochar en conditions contrôlées pour atténuer la toxicité des ETM et améliorer la qualité du sol ;

Discussion générale

- (3) Identifier et sélectionner des candidats, parmi la flore recensée sur site, celles présentant un potentiel de tolérance et de phytoremédiation, en vue de leur intégration dans un programme de restauration écologique en plantation mixte avec *C. glauca* ;
- (4) Étudier l'apport bénéfique du biochar, combiné à une souche bactérienne autochtone sur la germination des graines de *C. glauca* afin d'évaluer leur potentiel de bioaugmentation pour réussir l'installation des semis sur site pollué.

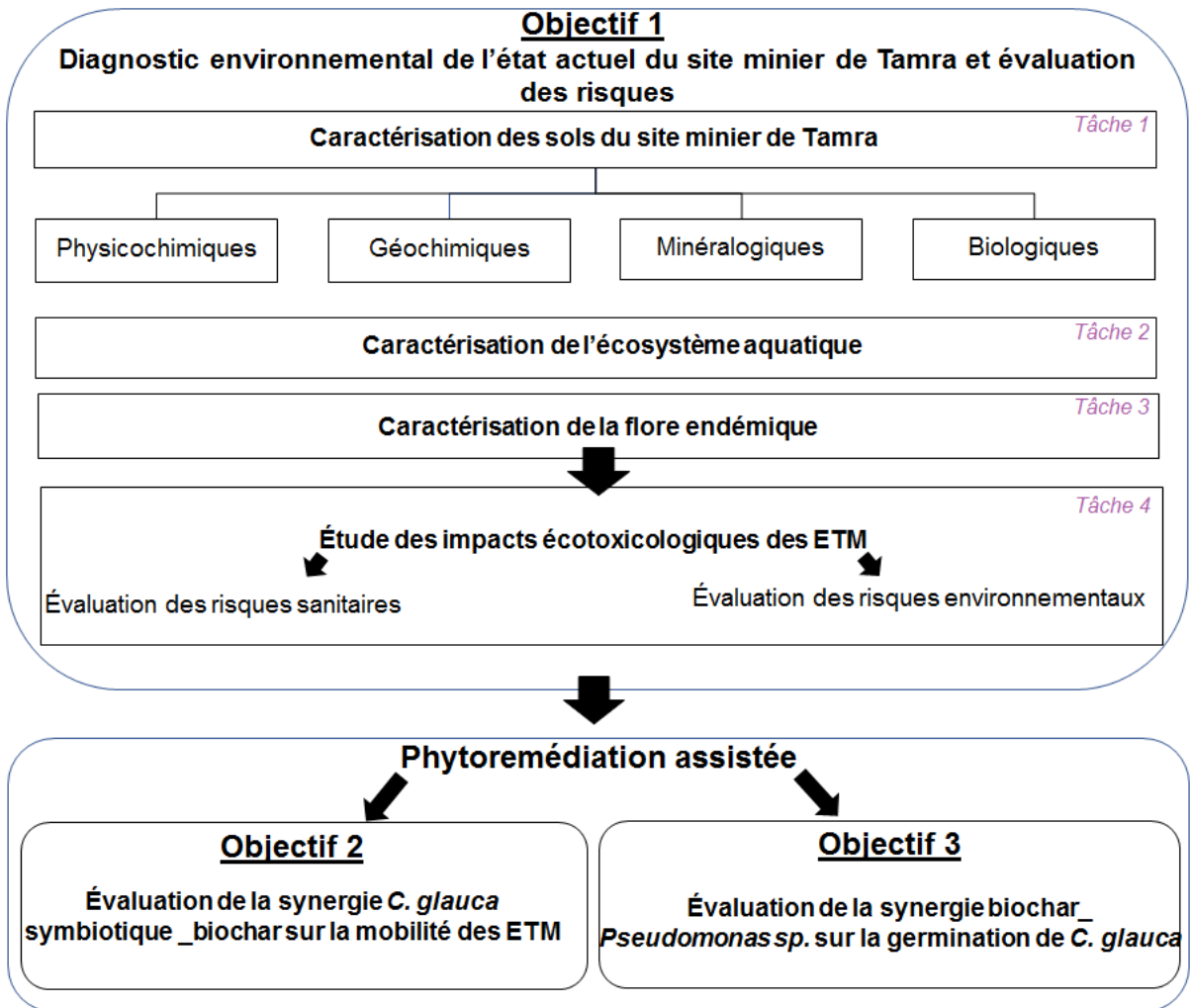


Figure 1. Logigramme de l'enchaînement des différentes tâches de ce projet de thèse.

Cette partie vise à discuter et à interpréter l'ensemble des résultats obtenus décrits dans les différents chapitres de cette thèse.

Distribution des ETM dans le site minier de Tamra

Le site minier de Tamra se distingue par son histoire géologique complexe, marquée par des processus magmatiques et hydrothermaux (Dekoninck *et al.*, 2018) et par la présence de multiples sources hydriques, nécessitant ainsi une approche bidimensionnelle (latérale et verticale) pour évaluer la spéciation des ETM présents dans le sol et leurs risques potentiels de contamination.

❖ Distribution latérale

L'étude visait à déterminer la répartition latérale de ces éléments traces dans le site minier de Tamra. Neuf échantillons représentatifs du sol de surface ont été collectés sur trois zones (amont, milieu et aval) puis ont fait l'objet d'une série d'analyses (physicochimiques, géochimiques et minéralogiques). Les résultats indiquent une forte contamination du site étudié par Fe, Mn, Zn, Pb, Cd et As dépassant largement les normes internationales de qualité des sols (FAO et CCEM). Cependant, ces éléments traces sont principalement concentrés dans les fractions résiduelles et oxydables, à l'exception du Fe et As qui sont associés uniquement à la fraction résiduelle. Cela suggère une mobilité limitée des éléments examinés et donc un risque environnemental immédiat plus faible (Sebei *et al.*, 2020; Akbarpour *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2023). Ces résultats concordent avec ceux de quelques autres sites miniers en Tunisie tels que Fedj Lahdoun, le bassin minier de Gafsa, Jabal Hallouf, Sidi Bouaoune, Jebel Ghazlane, Hammam Zriba et Jalta (Khelifi *et al.*, 2020; Sebei *et al.*, 2020; Achour *et al.*, 2022). Cependant, la forte mobilité de Cd observée en amont de la mine dans les deux sites T1 et T2 révèle un sérieux risque de contamination environnementale. En effet, le comportement du Cd est notamment influencé par la transformation de la ferrihydrite provoquée par les teneurs en Fe (II) et la formation de minéraux ferreux secondaires (Zhu *et al.*, 2022). De plus, dans les conditions réductrices associées à un apport en carbone organique, le Cd peut être immobilisé par la formation de minéraux ferreux secondaires, en particulier la magnétite (Fe₃O₄), qui agit comme un puits pour ce métal (Muehe *et al.*, 2013). Par ailleurs, les résultats obtenus par Tian *et al.* (2023) dans le site minier de fer de Guangxi en Chine, suggèrent qu'il existe une forte corrélation entre la mobilité de Cd, le pH et la teneur en carbone organique. Cela pourrait indiquer des mécanismes partiellement similaires à ceux observés dans notre étude. Ce constat fait en amont de la mine pourrait indiquer un risque de dispersion plus important dans

Discussion générale

l'écosystème environnant. Cependant, pour mieux évaluer ce comportement, il est nécessaire de comparer cette mobilité avec celle des autres éléments présents dans les sols miniers de Tamra. Cette comparaison pourrait permettre de mettre en évidence les tendances communes et les comportements spécifiques qui aideraient à comprendre la contamination de la zone d'étude. La mobilité des éléments étudiés (Fe, Zn, Mn, Cd, Pb et As) est fortement contrôlée par les conditions chimiques locales (pH et conductivité électrique). Elle est par ailleurs principalement régulée par la présence des oxydes de fer (hématite et goethite). Ces minéraux jouent un rôle déterminant dans la rétention des éléments traces en conditions oxydantes, tout en facilitant leur relargage lors des processus de dissolution réductrice (Negra, 1987; Decrée *et al.*, 2009; Bouzidi *et al.*, 2020). Ces résultats permettent de confirmer que l'hématite et la goethite sont les principales phases minérales porteuses des éléments étudiés sur le site minier de Tamra.

Bien que les résultats obtenus soient prometteurs, les limites de notre étude ne doivent pas être ignorées. En particulier, l'absence de la variabilité temporelle qui permet d'évaluer la spéciation latérale des ETM au fil du temps et en fonction des conditions hydrogéologiques. Par ailleurs, suite à l'hétérogénéité constatée du site, la multiplication des points d'échantillonnage serait nécessaire pour confirmer les résultats obtenus.

❖ Distribution verticale

L'étude de la répartition verticale des ETM dans le sol permet non seulement d'identifier l'origine de la contamination, mais également de comprendre leur comportement et de déterminer les risques de leur transfert vers les horizons profonds. Une coupe verticale représentative des conditions pédogéochimiques naturelles du site de Tamra a été réalisée pour cette fin. Neuf échantillons du sol au total ont ainsi été collectés, selon les horizons pédologiques, puis une série d'analyses physicochimiques et géochimiques a été menée. Les résultats révèlent des discontinuités lithologiques en fonction de leurs propriétés physicochimiques. Par ailleurs, l'hétérogénéité spatiale constatée tant latéralement que verticalement sur ce site est probablement le résultat d'une interaction complexe entre les facteurs lithogéniques et les impacts anthropiques incluant les activités minières et les perturbations des sols (Scarciglia *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2024). Ces observations sont comparables à celles faites sur certains sols contaminés des régions karstiques du sud-ouest de la Chine (Deng *et al.*, 2024). De plus, la variabilité des teneurs observée reflète à la fois

Discussion générale

l'influence des activités minières locales (extraction du fer et stockage) et les processus d'altération des matériaux d'origine (Bouzidi *et al.*, 2018, 2020). Cette variabilité traduit également la complexité des processus contrôlant la spéciation des éléments traces dominants dans le site minier de Tamra. Dans les différents horizons étudiés, les résultats obtenus montrent que le Zn, le Mn, le Pb et le Cd sont principalement concentrés dans les fractions résiduelles et oxydables rendant leur mobilité conditionnelle aux variations redox et pH. Tandis que le Fe et l'As sont associés à la fraction résiduelle, ce qui limite leur biodisponibilité et leur transfert dans l'environnement. La similarité observée entre la distribution latérale et verticale indique une certaine homogénéité dans le comportement géochimique des éléments examinés dans les sols du site. Cela souligne également la nécessité de prendre en considération leur évolution à long terme. Bien que la stabilisation de ces éléments soit largement assurée par leur prédominance dans la fraction résiduelle, la présence marquée de la fraction oxydable suggère que les variations des conditions redox telles que l'oxydation des sulfures et la dégradation de la matière organique pourraient les libérer. Cette dynamique augmente leur biodisponibilité et leur mobilité potentielle. Cela permet d'accroître le risque de transfert vers les horizons profonds et les compartiments aquatiques au fil du temps (Cai *et al.*, 2022 ; Sharma *et al.*, 2022). De plus, la corrélation observée entre la porosité (P) et les concentrations biodisponibles du Mn, du Zn et du Pb suggère que la structure physique du sol joue un rôle majeur dans la mobilité de ces polluants. En effet, la porosité élevée favorise la circulation de l'eau et des substances dissoutes telles que les ions dissous (éléments nutritifs et ETM) et les composés organiques. Cela pourrait créer un contact physique et chimique entre les éléments traces, les racines et les microorganismes (Robert & Chenu, 2021). Les racines peuvent ainsi libérer des acides organiques ou d'autres substances chimiques modifiant la forme chimique des ETM. Ces derniers peuvent ainsi transférer vers la phase échangeable. Cela pourrait expliquer la forte mobilité du Cd et du Mn dans les sols de surface (0 – 45 cm) (Chowdhury & Singer, 2023). Toutefois, l'influence en sus de la conductivité électrique (CE), de la matière organique (MO) ainsi que de la perméabilité (K) sur la biodisponibilité du Mn souligne le caractère multifactoriel du contrôle spécifique qui s'exerce vis-à-vis de ce métal. Au final, trois facteurs clés sont en œuvre, qui sont à la fois physiques (K et P), chimiques (CE) et biologiques (MO). Ces constats sont cohérents avec plusieurs études (Christensen, 1951 ;

Discussion générale

Loza *et al.*, 2018; Dey *et al.*, 2023; Brüggewirth *et al.*, 2024). Bien que les concentrations des éléments traces étudiés soient plus élevées en surface, parfois les couches plus profondes présentent des accumulations des ETM tels que le Cd à 468 cm de profondeur. Ceci pourrait être dû à la lixiviation, au transport *via* les pores et les fissures ainsi qu'à des apports anthropiques anciens. De plus, la migration du Cd pourrait être également influencée par l'acidité du sol, la présence des minéraux résiduels qui réduisent sa rétention ainsi qu'aux particules fines. Une telle observation était cohérente avec d'autres sites miniers en Tunisie (Khelifi *et al.*, 2024; Mezned *et al.*, 2022). Cependant, des études complémentaires de la variabilité spatiotemporelle seraient nécessaires. Cette approche pourrait évaluer la spéciation des ETM examinés dans les couches profondes au fil du temps et à d'autres points du site. Cela permettrait de mieux comprendre les risques de contamination des eaux souterraines.

Dans l'ensemble, l'étude de la spéciation (latérale et verticale) des éléments traces présents dans les sols miniers de Tamra a permis de répondre à la première question de recherche posée en introduction de cette section. En outre, elle montre une relative stabilité, mais met en évidence le risque d'une remobilisation en conditions environnementales changeantes. Elle souligne également l'importance de considérer à la fois l'héritage lithogénique et les apports anthropiques dans l'évaluation des risques environnementaux.

Les risques associés aux ETM dans les sols miniers de Tamra

L'évaluation des risques environnementaux confirme que la contamination multi-métallique des sols miniers de Tamra est dominée par des apports anthropiques, en particulier pour les éléments tels que le Zn, le Pb, le Cd et l'As. La comparaison entre les zones avoisinant l'installation minière et celles situées en amont et en aval de la mine soulève un impact spatial très étendu des activités extractives. Par ailleurs, un niveau élevé de la pollution a été observé dans le profil vertical jusqu'aux horizons les plus profonds (420 m de profondeur). Ceci a mis en évidence la migration progressive des ETM étudiés, confirmant leur capacité à se déplacer vers les eaux souterraines et augmentant ainsi le risque de pollution hydrique. Dans ce contexte, des études similaires ont souligné également les risques environnementaux des sites miniers de fer en Afrique du Nord. Par exemple, Nouri *et al.* (2017) ont étudié la contamination des sols de la mine de fer d'Ait Ammar au Maroc en soulignant les risques écologiques potentiels liés au Zn, Pb et Cd. De leur côté, Khafouri *et al.* (2022) ont également mis en évidence la migration

Discussion générale

des ETM depuis la mine de fer abandonnée d'Ouixane jusqu'aux eaux souterraines environnantes. Néanmoins il convient de noter que la plupart des études environnementales dans le contexte minier se concentrent principalement sur des mines abandonnées, tandis que les études sur les sites actifs restent relativement limitées. En Tunisie, la plupart des sites miniers présentent des risques comparables. A titre d'exemple, l'étude menée sur l'ancienne mine de Sidi Driss, située à proximité du site d'étude, a révélé des concentrations élevées des éléments traces jusque dans les horizons les plus profonds (Salhi *et al.*, 2023), suggérant là encore la possibilité d'une migration verticale facilitée par certaines conditions hydrogéologiques. Ces recherches confirment donc que l'activité minière, en particulier celle de l'extraction du Fe présente des risques environnementaux persistants.

Comme évoqué précédemment, les niveaux élevés de contamination mesurés dans les sols miniers de Tamra pourraient altérer leurs fonctions biologiques, en perturbant la biodiversité et les cycles des nutriments. Ces altérations peuvent avoir des répercussions considérables, affectant non seulement la qualité du sol, mais également l'écosystème environnant. Il est donc essentiel d'étudier la réponse biologique des sols, notamment par l'analyse de leurs activités enzymatiques, qui constituent un indicateur sensible de la qualité de la fertilité et de sa résilience face aux tresses chimiques (Genova *et al.*, 2024). Les résultats obtenus ont démontré la forte altération des sols associée à des niveaux d'acidité élevés et à une faible activité enzymatique. Ces observations indiquent un écosystème pédologique fortement perturbé par les éléments étudiés. Ce constat rejoint plusieurs études réalisées dans des contextes miniers similaires qui démontrent que les faibles activités enzymatiques du sol peuvent impacter la disponibilité des éléments nutritifs, perturber les cycles géochimiques et réduire la résilience du sol (Mourinha *et al.*, 2022; Martínez-Toledo *et al.*, 2023). Ces résultats soulignent donc que la fonction microbienne se trouve altérée par les ETM présents dans le sol, compromettant le fonctionnement biologique global (Martínez-Toledo *et al.*, 2023).

Cependant, malgré cette déficience enzymatique globale, certaines bactéries peuvent persister dans ces environnements sévèrement contaminés en développant des mécanismes d'adaptation spécifiques. Par conséquent, il est nécessaire d'évaluer la tolérance des souches bactériennes isolées des sols miniers de Tamra, afin d'identifier les isolats capables de résister à des concentrations élevées en ETM. Ces souches pourraient ensuite être utilisées dans de futures stratégies de bioremédiation. Parmi ces souches, seule la souche *Pseudomonas sp.*, Irchel a

Discussion générale

présenté un intérêt particulier en raison de sa forte tolérance à la concentration la plus élevée des mélanges polymétalliques testés ((Fe (578,08 mg.L⁻¹), Zn (993,4 mg.L⁻¹), Mn (763,54 mg.L⁻¹), Pb (0,74 mg.L⁻¹), Cd (1,92 mg.L⁻¹), As (102,1 mg.L⁻¹)) soulignant ainsi son remarquable potentiel d'adaptation. Ces observations sont en accord avec plusieurs études qui ont montré que différentes espèces du genre *Pseudomonas* isolées des milieux contaminés ont une tolérance exceptionnelle aux ETM. Ainsi, Vélez *et al.* (2021) ont découvert que *Pseudomonas* pouvait tolérer des concentrations de plomb supérieures à 50 mg/mL. Ces constats sont liés à leur mécanisme de tolérance impliquant la production d'exopolysaccharides et à leur capacité de biosorption de Pb atteignant une efficacité de 80 à 87 %. En outre, cette souche est caractérisée par sa tolérance à une gamme des métaux (Cd, Co, Cu, Ni et Zn) (Vélez *et al.*, 2021). Par ailleurs, certaines souches de *Pseudomonas* semblent même être tolérantes au double stress lié aux ETM et aux températures élevées (De Santis *et al.*, 2025). De plus, *Pseudomonas sp. Irchel* est caractérisé par de multiples traits PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) susceptibles d'améliorer la croissance et la santé des plantes. L'évaluation des réponses biologiques (enzymatiques et microbiologiques) du sol met en lumière la tolérance du microbiote et son rôle potentiellement bénéfique pour la qualité et la résistance des plantes.

L'inventaire floristique mené sur le site minier de Tamra apporte une dimension écologique intégrative, permettant de relier les altérations biologiques observées au niveau du sol et des microorganismes avec la dynamique de la végétation exposée à la pollution du site. Les résultats ont mis en évidence la capacité des plantes endémiques (uniquement des herbacées) à tolérer, à accumuler et / ou à stabiliser les ETM en excès. Deux espèces constituent des exceptions remarquables : (1) *Oxalis pes-caprae* qui possède une capacité élevée d'hyperaccumulation du fer, avec des concentrations dans leurs parties aériennes qui dépassent largement le seuil reconnu d'hyperaccumulation ($> 20\ 000\ \mu\text{g. g}^{-1}$); et (2) *Myosotis sicula*, accumulent préférentiellement les ETM étudiés dans leurs racines. Elle développe des mécanismes de confinement limitant leur translocation vers les parties aériennes, réduisant les risques pour les herbivores. Ainsi, l'évaluation des capacités de cette espèce (*M. sicula*) dans des sols pollués par les ETM constitue une approche originale de notre étude. Cette espèce n'ayant pas encore été identifiée comme candidate en phytoremédiation. Toutefois, les résultats ont montré une faible diversité spécifique de la végétation spontanée sur le site minier de Tamra par

Discussion générale

comparaison à celles enregistrées sur d'autres sites miniers en Afrique du nord (Zine *et al.*, 2023).

Par ailleurs, la plupart des espèces étudiées possèdent une double fonctionnalité. En effet, elles assurent conjointement la phytoextraction de certains ETM et jouent un rôle de phytostabilisation pour d'autres.

Des résultats similaires, obtenus en Algérie, ont confirmé le potentiel de *O. pes-caprae* dans différentes stratégies de phytoremédiation, particulièrement pour l'exclusion du Pb et la phytoextraction du Cd (Benhabyles *et al.*, 2025). Toutefois, certains paramètres doivent être considérés, en particulier la période d'échantillonnage qui peut affecter les teneurs en ETM. En effet, la biodisponibilité et l'accumulation des ETM par les plantes varient en fonction de la saison, du stade phénologique ainsi que des conditions climatiques (Lu *et al.*, 2021 ; Yu *et al.*, 2023). Par conséquent, il serait plus commode de réaliser des suivis saisonniers pour valider ou non le potentiel de phytoremédiation de *M. sicula*.

Les altérations enregistrées de la composition et de la diversité végétale du site minier de Tamra soulignent également la nécessité d'évaluer la qualité physico-chimique des eaux (de surface et de sources), compte tenu de leur influence majeure sur la durabilité et les dynamiques des communautés végétales locales, et les populations locales en particulier. Les résultats obtenus soulignent la présence de Cd, Pb et As dans les trois sources d'eau potable étudiées (Aïn El Bell, Aïn El Mota et Aïn El Rechech), avec une contamination particulièrement importante pour la source Aïn El Bell. Cette dernière est impropre à la consommation humaine et constitue une menace grave pour la santé, en particulier chez les élèves de l'école primaire de Tamra qui la consomment. Cependant, cette observation est sujette à des limites et incertitudes liées notamment à la seule campagne d'échantillonnage sans prise en compte de la variabilité temporelle et climatique.

Par ailleurs, le test d'écotoxicité réalisé avec les échantillons d'eaux prélevés (eaux de surface et eaux de sources) de la zone minière de Tamra a montré un effet inhibiteur sur la germination et la croissance des plantules de *L. sativum*. Ces résultats contestent ceux de Decrée *et al.* (2010), qui classaient ces trois sources comme potables selon les normes de l'OMS. Ces divergences peuvent s'expliquer par la variabilité des conditions hydrologiques, environnementales et anthropiques, au fil du temps. Il est essentiel de comprendre ces facteurs

Discussion générale

pour garantir une gestion et un suivi rigoureux de la qualité de l'eau. L'état actuel de la zone étudiée met en évidence la grande vulnérabilité des ressources en eau.

En complément de l'analyse des eaux du site minier de Tamra, le sol agit comme un réservoir des contaminants pouvant avoir également des impacts directs sur la santé humaine.

L'évaluation de la bioaccessibilité des ETM présents dans les sols (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) *via* le test SBET, constitue un outil précieux pour estimer le risque d'ingestion accidentelle et mieux cerner le risque sanitaire. Les résultats obtenus soulignent l'influence conjointe de la minéralogie et des conditions locales sur la bioaccessibilité gastrique des éléments étudiés. Cependant le test SBET ne simule que la phase gastrique (pH acide) en omettant la phase intestinale, où d'autres interactions peuvent affecter l'absorption des éléments étudiés. Afin de mieux estimer les risques sanitaires encourus par les populations vulnérables (enfants et adultes) aux ETM présents dans le site minier de Tamra, il est donc nécessaire de considérer 3 voies d'exposition : l'ingestion orale, l'inhalation de particules de sol par la bouche et le nez et l'absorption cutanée.

Les résultats obtenus ont démontré que des risques élevés, principalement non cancérigènes pèsent sur la population locale de Tamra. Cependant, le risque cancérigène lié à l'As était très élevé pour les deux groupes d'âge ($2,17E+4$ pour les enfants et $8,06E+6$ pour les adultes), alors que le Cd présente un risque potentiel chez les enfants ($4,35E+5$) et le Zn chez les adultes uniquement ($0,022$). Ces observations étaient cohérentes avec d'autres études internationales menées sur les sites miniers de fer (Diami et al., 2016 ; Aluko et al., 2018 ; Zeng et al., 2024) Bien que les ETM étudiés diffèrent d'un site à l'autre, ces études ont toutes montré que l'exposition se produite principalement par ingestion. Ces constats renforcent donc la nécessité pertinente de stratégies de gestion des risques, notamment la mise en œuvre de procédés de phytoremédiation des sols pollués notamment en ETM, afin de réduire leur impact sur l'écosystème et la santé des communautés locales. L'ensemble de ces études ont permis de répondre à la deuxième question de recherche posée en introduction de cette section. Cependant, elles sont soumises à certaines limites et incertitudes liées en particulier aux méthodes d'échantillonnage, à l'homogénéité du site ainsi qu'à la variabilité individuelle.

Stratégie de phytoremédiation assistée

L'étude menée s'est attachée à évaluer le potentiel de la phytoremédiation assistée sur deux caractéristiques du site minier de Tamra qui sont rarement étudiées conjointement : i) la

Discussion générale

contamination du sol par les ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As, et *ii*) le stress hydrique imposé par la présence des ETM en excès. Ce travail offre une contribution novatrice, notamment par le choix de *Casuarina glauca*, une espèce actinorhizienne symbiotique avec *Frankia*, combinée à l'apport de biochar issu de l'*Eucalyptus* (BEu). Les résultats ont montré la forte capacité de *C. glauca* à accumuler tous les éléments toxiques étudiés (Fe > 10 000 µg/g, Zn > 3000 µg/g, Pb > 1000 µg/g, Cd > 100 µg/g et As > 1000 µg/g). L'amendement du sol avec 5% BEu (m/m) a permis par ailleurs d'améliorer la croissance et le comportement écophysologique de *C. glauca*, réduisant les impacts du stress oxydatif et limitant le transfert et l'accumulation de Zn vers les parties aériennes. Par ailleurs, les nodules de *Frankia* formés ont agi comme une barrière biologique vis-à-vis des ETM rhizosphériques. Ainsi, l'approche combinée *C. glauca*-*Frankia*-biochar semble donc être une stratégie prometteuse pour la réhabilitation efficace des sites miniers. Cependant, certaines limites doivent être mentionnées dans cette étude : (1) les essais ont été menés en serre ne reflètent pas les conditions naturelles de terrain notamment la variation climatique ; (2) la durée relativement courte de l'expérience (6 mois) ne permet pas d'étudier l'impact de biochar-*Frankia* à long terme; (3) une seule dose de BEu a été testée ce qui ne permet les effets d'autre concentration ; et finalement, (4) aucune analyse approfondie du microbiome du sol n'a été réalisée.

Cette étude a apporté une réponse à la troisième question de recherche posée précédemment. Ces observations ouvrent néanmoins de nouvelles pistes importantes qu'il s'agira d'explorer, notamment (1) la mise en place d'essais à plus grande échelle directement sur le site minier ; (2) l'examen de l'effet de différentes doses et types de biochar ; (3) la prolongation de la durée de cette expérimentation sur une longue période (2 à 3 ans) afin de confirmer les résultats obtenus ; et (4) l'exploration d'approches combinant bio-inoculant et biochar pour évaluer leur efficacité dans un contexte marqué à la fois par la sécheresse édaphique et la forte contamination multi-métalliques.

Ainsi, l'étude de l'effet combiné du biochar et des bactéries PGPR a été menée afin d'évaluer leur influence sur la germination de graines endémiques de *C. glauca* et plus largement afin de valider la possibilité de mettre en place des stratégies de phytomanagement adaptées aux sites miniers. Pour cela, un test de germination (sans ajout des éléments traces) a été conduit en conditions contrôlées associant (1) la souche bactérienne *Pseudomonas sp.* (souche *irchel*) isolat identifié comme très tolérant aux ETM présents dans les sols minier de Tamra et

Discussion générale

possédant plusieurs traits PGPR (production d'auxine, fixation de l'azote, production de NH_4^+ , solubilisation des phosphates) (2) avec un extrait aqueux de biochar d'Eucalyptus (BEu) choisi pour ses propriétés de conditionnement du sol et son rôle potentiel dans l'amélioration de la germination de *C. glauca*. Cette expérience a permis de mettre en évidence une synergie fonctionnelle sur la germination et la croissance initiale de *C. glauca* entre l'extrait aqueux de BEu et la souche choisie se traduisant par une stimulation de la germination. Plusieurs études antérieures appuient ce constat, confirmant l'effet bénéfique de l'interaction biochar-PGPR sur la vigueur des semis et le développement des plantes en phase précoce en conditions contaminées (Heydari *et al.*, 2023 ; Kumar *et al.*, 2021 ; Zou *et al.*, 2024). Bien que, cette expérience ait été effectuée dans des conditions artificielles contrôlées et en absence des contaminants (ETM), ce qui entrave leur extrapolation directe aux conditions réelles du site d'étude, ces observations suggèrent que la combinaison BEu (extrait aqueux) – PGPR, notamment avec la souche *Pseudomonas sp.*, représente une stratégie prometteuse pour améliorer la germination de *C. glauca*, ouvrant potentiellement la voie à de futures recherches parmi lesquelles : i) l'utilisation de *C. glauca*, espèce forestière reconnue pour sa tolérance à des contraintes sévères (salinité, pollution polymétallique, déficit hydrique), pour la réhabilitation des sols miniers; ii) l'évaluation de la combinaison biochar-bactéries PGPR spécifiquement dans le contexte minier nord-africain afin de tenir compte des particularités pédoclimatiques régionales; iii) l'étude des stratégies intégrées associant les isolats des sols contaminés, la caractérisation de leurs traits PGPR, des essais de tolérance polymétallique et enfin leur application via bioaugmentation dans des conditions réelles (in situ).

Perspectives de recherche

Les résultats de cette thèse permettent d'envisager plusieurs pistes pour renforcer et approfondir les observations mises en évidence :

(1) Afin de mieux caractériser l'évolution spatiotemporelle de la spéciation et du comportement des éléments traces présents dans le sol de la mine de Tamra, il serait judicieux de mener des campagnes d'échantillonnage complémentaires dans d'autres zones en tenant compte de l'activité minière. Ces campagnes devraient inclure des prélèvements à différentes profondeurs et être réalisées au cours de la saison hivernale et estivale ;

Discussion générale

- (2) Suite aux résultats obtenus de la spéciation des ETM présents dans les sols de Tamra et aux risques environnementaux associés, une analyse de la solution du sol serait indispensable pour évaluer les formes solubles et mobiles de six éléments étudiés, directement accessibles aux plantes et aux microorganismes ;
- (3) Comme suite de l'évaluation de la distribution verticale des éléments traces, l'étude minéralogique via la diffraction des rayons X (DRX) et le microscope électronique à balayage (MEB) serait indispensable pour déterminer leur phase porteuse et juger leur stabilité. Cette approche permettra de mieux comprendre les processus de rétention et de spéciation des ETM étudiés en profondeur, d'anticiper leur déplacement vers les nappes phréatiques et l'établissement d'une base solide pour élaborer des stratégies adaptées de gestion et de réhabilitation des sites miniers. Cela nous permettra également de les comparer aux résultats présentés dans l'article « Assessment of Trace Element Soil Contamination and Environment Risks in Soils from Iron Mining Areas » accepté dans *International Journal of Environmental Science and Technology* ;
- (4) En raison de l'hétérogénéité spatiale de la répartition des ETM et des caractéristiques physico-chimiques du site minier de Tamra, il serait judicieux de cartographier leur spéciation. Cette approche permettrait à la fois de visualiser cette hétérogénéité observée ainsi que d'identifier les zones critiques pour orienter plus efficacement les stratégies de gestion et de remédiation ;
- (5) Afin d'affiner l'évaluation des risques sanitaires, il serait intéressant de déterminer les niveaux des ETM dans les produits animaux et végétaux provenant des zones agricoles proches de la mine de Tamra. En outre, le suivi spatio-temporel de la qualité des eaux, particulièrement celles destinées à l'alimentation humaine, pendant les deux périodes hivernale et estivale, favoriserait une meilleure compréhension de l'impact des fluctuations saisonnières sur la mobilité et la biodisponibilité de ces contaminants ;
- (6) Afin de réduire l'impact des ETM sur la santé de la communauté locale, il serait important de limiter l'exposition humaine à ces polluants par des mesures réglementaires par l'ANPE (Agence Nationale de Protection de l'Environnement, Ministère de l'Industrie et de l'Énergie, Ministère de la Santé). De plus, la sensibilisation des communautés locales aux

Discussion générale

dangers ainsi que la mise en place d'un suivi sanitaire permanent pour évaluer l'efficacité des mesures prises. Et enfin, la mise en place des barrières physiques telles que des zones tampons végétalisées pour réduire l'érosion et la dispersion de ces contaminants vers les zones environnantes ;

(7) Dans une prochaine étape de l'approche expérimentale en pots, il serait intéressant de suivre cette approche à long terme pour tester la solidité et l'efficacité économique et environnementale des procédés proposés (travail en cours) ;

(8) Ce projet de thèse met en évidence le potentiel inédit de *Myosotis sicula* en tant qu'un candidat intéressant ; il serait utile de l'associer à *C. glauca*, compte tenu de son adaptation aux conditions pédoclimatiques locales, ce qui contribuerait à limiter l'érosion du sol, la dispersion des poussières contaminées et le lessivage des éléments toxiques ;

(9) Afin de confirmer la synergie entre *C. glauca*- *Frankia*- biochar, en conditions semi-contrôlées, apport majeur de cette thèse (Ayadi *et al.*, 2025), un essai en plein champ est actuellement en cours sur une petite parcelle sur le site minier de Tamra. Cette expérience utilise de jeunes plants de *C. glauca* cultivés avec et sans ajout de biochar (3% ; m/m). Elle visera à examiner l'influence du biochar sur la croissance, la résistance au stress et la stabilisation des ETM dans les conditions réelles. Dans une prochaine étape, il est prévu d'inoculer certaines plantes avec *Pseudomonas sp. (Irchel)* un autre apport spécifique de notre recherche, afin d'étudier les effets synergiques entre le biochar et le microbiote sur la phytoremédiation et la santé des plantes.

Conclusion

Bien que les risques environnementaux liés à l'activité minière de Tamra constituent un défi important, les avantages économiques, tels que la création d'emplois et le développement des infrastructures, pourraient compenser ces risques. Cependant, en l'absence de stratégies efficaces de gestion environnementale, les impacts écologiques et sanitaires à long terme pourraient l'emporter sur les avantages économiques à long terme.

Cette étude met clairement en évidence les effets néfastes de la contamination des sols miniers de Tamra par les ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As), tant sur sa qualité chimique que sur ses fonctions biologiques, en soulignant ses impacts considérables sur l'écosystème et la santé

Discussion générale

humaine. L'association de *Casuarina glauca* et du biochar d'*Eucalyptus* apparaît donc comme une approche prometteuse pour limiter la mobilité de certains éléments. Toutefois des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la durabilité et l'efficacité et la transférabilité de cette stratégie en conditions réelles.

Conclusion générale et perspectives

Au début des années 90, la majorité des mines tunisiennes ont cessé leurs activités. Toutefois, la mine de fer de Tamra constitue une exception : il s'agit de la dernière mine à ciel ouvert encore en activité caractérisée par une structure géologique complexe. Située dans le district minier de Nefza, elle joue un rôle primordial dans le développement économique du pays. Néanmoins, ce site est particulièrement vulnérable face aux conditions climatiques, qui peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement et la santé des populations locales. Cette situation met en évidence la nécessité d'agir afin de lutter contre les risques qui y sont associés.

Dans ce contexte, la présente étude repose sur i) l'étude de la spéciation des ETM dans les sols miniers de Tamra et ii) l'utilisation de procédés de phytoremédiation à l'aide de *C. glauca*, une espèce ligneuse actinorhizienne capable de développer des nodosités fixatrices d'azote avec des bactéries filamenteuses du sol du genre *Frankia*, et du biochar d'*Eucalyptus* afin de réduire l'impact des ETM (Fe, Zn, Mn, Pb, Cd et As) en excès dans les sols miniers de Tamra.

En Tunisie, cette phytotechnologie de dépollution associant espèces ligneuses et biochar demeure peu explorée, en particulier dans le cadre de la réhabilitation des sols miniers.

Pour atteindre ces objectifs, une approche multidisciplinaire a été mise en œuvre afin de mieux comprendre le fonctionnement du site minier et le comportement des éléments traces métalliques (ETM) dans les sols miniers de Tamra. L'étude s'articule autour de quatre volets complémentaires : i) une analyse physicochimique pour caractériser les propriétés du sol et identifier les facteurs clés contrôlant la spéciation des ETM ; ii) une caractérisation minéralogique, visant à déterminer les phases porteuses et la répartition minérale des éléments étudiés dans les sols de surface ; iii) une analyse biologique, pour caractériser les fonctions du sol ; et finalement ; iv) un essai de phytoremédiation assistée, afin d'évaluer le potentiel *C. glauca* et de biochar d'*Eucalyptus* pour améliorer la stabilisation des ETM.

Les résultats obtenus ont démontré l'efficacité de *C. glauca* en combinaison avec le biochar, comme solution écologique de phytoremédiation des sols contaminés du site minier de Tamra. Ce couplage entre restauration écologique et valorisation de biomatériaux apparaît comme une perspective opérationnelle prometteuse pour la gestion durable des sols miniers contaminés en contexte semi-aride.

Références bibliographiques

- Abbruzzini, T. F., Pano, B. L. P., Palomino, L. M., Loredó-Jasso, A. U., Larrocea, M. D. P. O., Vargas, C. P., & Ramirez, V. M. P. (2025). Technosols constructed from urban waste enhance carbon stabilization through improved soil aggregation. *EQA-International Journal of Environmental Quality*, 67, 71-85. DOI: 10.6092/issn.2281-4485/21163
- Abdul-Baki, A. A., & Anderson, J. D. (1973). Vigor Determination in Soybean Seed by Multiple Criteria1. *Crop Science*, 13(6), 630-633. <https://doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183X001300060013x>
- Abid, M. Y., Aissa, L. B., & Tlig, S. (2006). L'impact des rejets miniers sur la qualité des eaux et des sédiments encaissants du Barrage de Sidi el Barrak (Région de Nefza Nord-Ouest Tunisien).
- Abideen, Z., Koyro, H. W., Hasnain, M., Hussain, M. I., El-Keblawy, A., El-Sheikh, M. A., & Hasanuzzaman, M. (2024). Biochar Outperforms Biochar-Compost Mix in Stimulating Ecophysiological Responses and Enhancing Soil Fertility under Drought Conditions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s42729-024-02073-5>
- Abukari, A., & Cobbinah, P. (2024). Can Biochar Made from Rice Husk Affect Savanna Soils' pH, Electrical Conductivity, and Soil Respiration?. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 12(6), 978-983. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v12i6.978-983.6741>
- Achour, Y., Souissi, R., Tlil, H., Souissi, F., & Motelica-Heino, M. (2022). Mobility of Potentially Toxic Elements (Pb, Zn, Cd, As, Sb) in Agricultural Carbonated Soils Contaminated by Mine Tailings (Northern Tunisia) : A New Kinetic Leaching Approach with Organic Acids. *Water*, 14(20), 3337. <https://doi.org/10.3390/w14203337>
- Ackermann, J., Vetterlein, D., Kuehn, T., Kaiser, K., & Jahn, R. (2010). Minerals controlling arsenic distribution in floodplain soils. *European Journal of Soil Science*, 61(4), 588-598. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01260.x>
- Acosta, J. A., Jansen, B., Kalbitz, K., Faz, A., & Martínez-Martínez, S. (2011). Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere*, 85(8), 1318-1324. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.046>
- Acosta-Martínez, V., & Tabatabai, M. A. (2000). Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of soils*, 31, 85-91. <https://doi.org/10.1007/s003740050628>
- Acosta-Martínez, V., Zobeck, T. M., Gill, T. E., & Kennedy, A. C. (2003). Enzyme activities and microbial community structure in semiarid agricultural soils. *Biology and Fertility of soils*, 38, 216-227. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0626-1>
- Adamo, P., Agrelli, D., Zampella, M., & Caporale, A. G. (2024). Chemical speciation to assess bioavailability, bioaccessibility, and geochemical forms of potentially toxic metals (PTMs) in polluted soils. In *Environmental geochemistry* (pp. 211-269). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-13801-0.00007-4>
- Adetunji, A. T., Lewu, F. B., Mulidzi, R., & Ncube, B. (2017). The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17(3), 794-807. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018>
- Adetunji, A. T., Ncube, B., Meyer, A. H., Olatunji, O. S., Mulidzi, R., & Lewu, F. B. (2021). Soil pH, nitrogen, phosphatase and urease activities in response to cover crop species, termination stage and termination method. *Heliyon*, 7(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05980>
- Adimalla, N. (2020). Heavy metals contamination in urban surface soils of Medak province, India, and its risk assessment and spatial distribution. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(1), 59-75. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00270-1>
- Aher, D. N., Kele, V. D., Malwade, K. D., & Shelke, M. D. (2016). Lake water quality indexing to identify suitable sites for household utility: a case study Jambhulwadi Lake; Pune (MS). *International Journal of Engineering Research and Applications*, 6(5), 16-21.
- Ahmad, B., Rahim, H. U., Mian, I. A., & Ali, W. (2025). Synergistic Biochar–Nitrogen Application Enhances Soil Fertility and Compensates for Nutrient Deficiency, Improving Wheat Production in Calcareous Soil. *Sustainability*, 17(5), 2321. <https://doi.org/10.3390/su17052321>
- Ahmed, N., Vione, D., Rivoira, L., Carena, L., Castiglioni, M., & Bruzzoniti, M. C. (2021). A review on the degradation of pollutants by fenton-like systems based on zero-valent iron and persulfate: Effects of reduction potentials, pH, and anions occurring in waste waters. *Molecules*, 26(15), 4584. <https://doi.org/10.3390/molecules26154584>
- Ahmed, T., Shahid, M., Noman, M., Hussain, S., Khan, M. A., Zubair, M., ... & Mahmood, F. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological tools for nutrient management and soil sustainability. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability: From Theory to Practices*, 95-110. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_5

Références bibliographiques

- Ahn, Y., Yun, H.-S., Pandi, K., Park, S., Ji, M., & Choi, J. (2020). Heavy metal speciation with prediction model for heavy metal mobility and risk assessment in mine-affected soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(3), 3213-3223. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06922-0>
- Akbarpour, F., Gitipour, S., Baghdadi, M., & Mehrdadi, N. (2021). Correlation between chemical fractionation of heavy metals and their toxicity in the contaminated soils. *Environmental Earth Sciences*, 80(21), 726. <https://doi.org/10.1007/s12665-021-10024-x>
- Akrout, D., Ahmadi, R., Mercier, E., & Montacer, M. (2012). Natural hydrocarbon accumulation related to formation overpressured interval; study case is the Saharan platform (Southern Tunisia). *Arabian Journal of Geosciences*, 5, 849-857. <https://doi.org/10.1007/s12517-011-0287-6>
- Alayet, F., Mezned, N., Sebai, A., & Abdeljaouad, S. (2017). Continuum removed band depth analysis for carbonate mining waste quantification using x-ray diffraction and hyperspectral spectroscopy in the north of Tunisia. *Journal of Applied Remote Sensing*, 11(1), 016021-016021. <https://doi.org/10.1117/1.JRS.11.016021>
- Ali, J., Tuzen, M., Jatoui, W. B., Feng, X., Sun, G., & Saleh, T. A. (2024). A review of sequential extraction methods for fractionation analysis of toxic metals in solid environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117639. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117639>
- Ali, S., Shahid, M. J., Hussain, A., Rizwan, M., Ahmad, A., & Adrees, M. (2021). Metals phytoextraction by Brassica species. Approaches to the remediation of inorganic pollutants, 361-384. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6221-1_18
- Alkharabsheh, H. M., Seleiman, M. F., Battaglia, M. L., Shami, A., Jalal, R. S., Alhammad, B. A., ... & Al-Saif, A. M. (2021). Biochar and its broad impacts in soil quality and fertility, nutrient leaching and crop productivity: A review. *Agronomy*, 11(5), 993. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050993>
- Allard, S., Gutierrez, L., Fontaine, C., Croué, J.-P., & Gallard, H. (2017). Organic matter interactions with natural manganese oxide and synthetic birnessite. *Science of The Total Environment*, 583, 487-495. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717301249>
- Alleman, A. B., & Peters, J. W. (2023). Mechanisms for generating low potential electrons across the metabolic diversity of nitrogen-fixing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(5), e00378-23. <https://doi.org/10.1128/aem.00378-23>
- Allison, S. (2001). Urease protocol. stanford.edu.
- Alsherif, E. A., Al-Shaikh, T. M., & Abdelgawad, H. (2022). Heavy Metal Effects on Biodiversity and Stress Responses of Plants Inhabiting Contaminated Soil in Khulais, Saudi Arabia. *Biology*, 11(2), 164. <https://doi.org/10.3390/biology11020164>
- Altundag, H., Albayrak, S., Dundar, M. S., Tuzen, M., & Soylak, M. (2015). Investigation of the Influence of Selected Soil and Plant Properties from Sakarya, Turkey, on the Bioavailability of Trace Elements by Applying an In Vitro Digestion Model. *Biological Trace Element Research*, 168(1), 276-285. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0330-7>
- Alvarenga, P., Guerreiro, N., Simões, I., Imaginário, M. J., & Palma, P. (2021). Assessment of the Environmental Impact of Acid Mine Drainage on Surface Water, Stream Sediments, and Macrophytes Using a Battery of Chemical and Ecotoxicological Indicators. *Water*, 13(10), 1436. <https://doi.org/10.3390/w13101436>
- Amalina, F., Abd Razak, A. S., Krishnan, S., Sulaiman, H., Zularisam, A. W., & Nasrullah, M. (2022). Advanced techniques in the production of biochar from lignocellulosic biomass and environmental applications. *Cleaner Materials*, 6, 100137. <https://doi.org/10.1016/j.clema.2022.100137>
- Amri, M. F., Husen, E., Tjahjoleksono, A., & Wahyudi, A. T. (2022). Alkaline phosphatase activity of plant growth-promoting Actinomycetes and their genetic diversity based on the phoD gene. *HAYATI Journal of Biosciences*, 29(3), 360-369. <https://doi.org/10.4308/hjb.29.3.360-369>
- Angon, P. B., Islam, M. S., Kc, S., Das, A., Anjum, N., Poudel, A., & Suchi, S. A. (2024). Sources, effects and present perspectives of heavy metals contamination: Soil, plants and human food chain. *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28357>
- Anwar, H., Wang, X., Hussain, A., Rafay, M., Ahmad, M., Latif, M., Jamshaid, M. U., Khalid, I., Dar, A., & Mustafa, A. (2021). Comparative effects of bio-wastes in combination with plant growth-promoting bacteria on growth and productivity of okra. *Agronomy*, 11(10), 2065. <https://doi.org/10.3390/agronomy11102065>
- Aponte, H., Medina, J., Butler, B., Meier, S., Cornejo, P., & Kuzyakov, Y. (2020a). Soil quality indices for metal (loid) contamination: An enzymatic perspective. *Land Degradation & Development*, 31(17), 2700-2719. <https://doi.org/10.1002/ldr.3630>

Références bibliographiques

- Aponte, H., Meli, P., Butler, B., Paolini, J., Matus, F., Merino, C., ... & Kuzyakov, Y. (2020b). Meta-analysis of heavy metal effects on soil enzyme activities. *Science of the Total Environment*, 737, 139744. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139744>
- Appanna, V. D., Gazsó, L. G., & Pierre, M. S. (1996). Multiple-metal tolerance in *Pseudomonas fluorescens* and its biotechnological significance. *Journal of Biotechnology*, 52(2), 75-80. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(96\)01623-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(96)01623-9)
- Ariyakanon, N. (2023). Application of local species for sustainable phytoremediation: Environment and Natural Resources Journal, 21(5), 381-389. DOI: 10.32526/enrj/21/20230125
- Arora, N. K., Tewari, S., & Singh, R. (2013). Multifaceted plant-associated microbes and their mechanisms diminish the concept of direct and indirect PGPRs. In *Plant microbe symbiosis: Fundamentals and advances* (pp. 411-449). New Delhi: Springer India. https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.1007/978-81-322-1287-4_16
- Arthur, E., Tuller, M., Norgaard, T., Moldrup, P., Chen, C., Rehman, H. U., Weber, P. L., Knadel, M., & de Jonge, L. W. (2023). Contribution of organic carbon to the total specific surface area of soils with varying clay mineralogy. *Geoderma*, 430, 116314. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.116314>
- Arzoo, K., Balodi, R., Kalmesh, M., & Kumar, J. (2024). Indole acetic acid (IAA) mediated plant growth promotion activity of fluorescent *Pseudomonads* and *Bacillus* spp. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 27(7), 162-171. <https://doi.org/10.9734/jabb/2024/v27i7976>
- Asher, A. S., Samuel, K. E., & Mary, D. S. (2020). Analytical method for comparison of suitable wet digestion methods for heavy metal analysis in soil around a cement industry. *Int. J. Res. Innov. Sci*, 7, 41-47.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, A., Islam, M. Z., Shahidullah, S. M., & Meon, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7). <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i7.60097>
- Attademo, A. M., Sanchez-Hernandez, J. C., Lajmanovich, R. C., Repetti, M. R., & Peltzer, P. M. (2021). Enzyme activities as indicators of soil quality: Response to intensive soybean and rice crops. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05211-2>
- Ayachi, M. S., Zagarni, M. F., Snoussi, A., Bahrouni, N., Gzam, M., Assi, I. B., ... & Rhaïem, H. B. (2016). The Paleocene-Lower Eocene series of the Gafsa basin (South-Central Tunisia): integrated stratigraphy and paleoenvironments. *Arabian Journal of Geosciences*, 9, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s12517-016-2403-0>
- Ayadi, O., Tlili, K., Bourgerie, S., & Bejaoui, Z. (2025). Eucalyptus-Biochar Application for Mitigating the Combined Effects of Metal Toxicity and Osmotic-Induced Drought in *Casuarina glauca* Seedlings. *Land*, 14(7), 1423. <https://doi.org/10.3390/land14071423>
- Ayari, J., & Charef, A. (2016). Spatial distribution and contamination assessment of trace metals in agricultural soils around Sidi Ahmed Pb-Zn abandoned mine, Tunisia. *International journal of innovation and applied studies*, 17(2), 646.
- Ayari, J., Barbieri, M., Agnan, Y., Sellami, A., Braham, A., Dhaha, F., & Charef, A. (2021). Trace element contamination in the mine-affected stream sediments of Oued Rarai in north-western Tunisia : A river basin scale assessment. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(10), 4027-4042. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00887-1>
- Ayari, J., Barbieri, M., Barhoumi, A., Boschetti, T., Braham, A., Dhaha, F., & Charef, A. (2023). Trace metal element pollution in media from the abandoned Pb and Zn mine of Lakhout, Northern Tunisia. *Journal of Geochemical Exploration*, 247, 107180. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2023.107180>
- Ayed, N. B. (1986). L'évolution tectonique de l'avant-pays de la chaîne alpine de Tunisie du début du Mésozoïque à l'Actuel (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).
- Ayyub, M., Zahir, Z., Asghar, H., & Shahid, M. (2024). Comparison of different inoculation methods and carrier materials for allelopathic *Pseudomonas* strains in weed management of direct-seeded rice. *Soil and Environment*, 43, 65-77. <https://doi.org/10.25252/SE/2024/243344>
- Azad, D., Pateriya, R. N., Arya, R., & Sharma, R. K. (2022). Biological Treatment for Biochar Modification: Opportunities, Limitations, and Advantages. In *Engineered Biochar: Fundamentals, Preparation, Characterization and Applications* (pp. 85-104). Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-2488-0_6
- Aziz, K. H. H., Mustafa, F. S., Omer, K. M., Hama, S., Hamarawf, R. F., & Rahman, K. O. (2023). Heavy metal pollution in the aquatic environment: efficient and low-cost removal approaches to eliminate their toxicity: a review. *RSC advances*, 13(26), 17595-17610. <https://doi.org/10.1039/D3RA00723E>

Références bibliographiques

- Aziza, K., Naïma, E. G., Naoual, R., Khalid, D., Mustapha, I., & Wifak, B. (2020). Leaching of heavy metals and enzymatic activities in un-inoculated and inoculated soils with Yeast Strains. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 29(8), 860-879. <https://doi.org/10.1080/15320383.2020.1779176>
- Azizi, M., Faz, A., Zornoza, R., Martinez-Martinez, S., & Acosta, J. A. (2023). Phytoremediation Potential of Native Plant Species in Mine Soils Polluted by Metal(loid)s and Rare Earth Elements. *Plants*, 12(6), 1219. <https://doi.org/10.3390/plants12061219>
- Azizsoltani, E., Honarjoo, N., & Ayoubi, Sh. (2019). How Soil Pore Distribution Could Help in Soil Quality Studies as an Appropriate Indicator. *Eurasian Soil Science*, 52(6), 654-660. <https://doi.org/10.1134/s1064229319060036>
- Aznar-Sanchez, J., García-Gómez, J., Velasco-Muñoz, J., & Carretero-Gómez, A. (2018). Mining waste and its sustainable management: Advances in worldwide research. *Minerals* 8 (7), 284. <https://doi.org/10.3390/min8070284>
- Baah, D. S., Gikunoo, E., Arthur, E. K., Agyemang, F. O., Foli, G., Koomson, B., & Opoku, P. (2023). Anthropogenic Sources and Risk Assessment of Heavy Metals in Mine Soils : A Case Study of Bontesso in Amansie West District of Ghana. *Journal of Chemistry*, 2023, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2023/6760154>
- Bahadir, P. S., Liaqat, F., & Eltem, R. (2018). Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 42(2), 183-196. <https://doi.org/10.3906/BOT-1706-51>
- Bai, X. T., Wang, J., Dong, H., Chen, J. M., & Ge, Y. (2021). Relative importance of soil properties and heavy metals/metalloids to modulate microbial community and activity at a smelting site. *Journal of Soils and Sediments*, 21, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02743-8>
- Baig, M. A., Ahmad, J., Ali, A. A., & Qureshi, M. I. (2019). Role of sulfur metabolism in cadmium tolerance. In *Cadmium Tolerance in Plants*, 335-365. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815794-7.00013-8>
- Balagopal, A., Alva, A., Chandrashekar, H., Thorat, S., Kaniyassery, A., Koley, A., Balachandran, S., Govender, N., & Muthusamy, A. (2025). The fate of heavy metals and metalloids in plant systems -a comprehensive review. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 107, 1114-1171. <https://doi.org/10.1080/02772248.2025.2515403>
- Banach, A., Kuźniar, A., Marzec-Grządział, A., Gałazka, A., & Wolińska, A. (2021). Phenotype switching in metal-tolerant bacteria isolated from a hyperaccumulator plant. *Biology*, 10(9), 879. <https://doi.org/10.3390/biology10090879>
- Bandyopadhyay, S., & Maiti, S. K. (2021). Different soil factors influencing dehydrogenase activity in mine degraded lands—state-of-art review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(9), 360. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05302-0>
- Banuelos, G. S., & Ajwa, H. A. (1999). Trace elements in soils and plants: an overview. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, 34(4), 951-974. <https://doi.org/10.1080/10934529909376875>
- Bao, Y., Bolan, N. S., Lai, J., Wang, Y., Jin, X., Kirkham, M. B., Wu, X., Fang, Z., Zhang, Y., & Wang, H. (2022). Interactions between organic matter and Fe (hydr)oxides and their influences on immobilization and remobilization of metal(loid)s : A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(22), 4016-4037. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1974766>
- Barčauskaitė, K., Anne, O., Mockevičienė, I., Repšienė, R., Šiaudinis, G., & Karčauskienė, D. (2023). Determination of heavy metals immobilization by chemical fractions in contaminated soil amended with biochar. *Sustainability*, 15(11), 8677. <https://doi.org/10.3390/su15118677>
- Bashir, I., Lone, F. A., Bhat, R. A., Mir, S. A., Dar, Z. A., & Dar, S. A. (2020). Concerns and threats of contamination on aquatic ecosystems. *Bioremediation and biotechnology: sustainable approaches to pollution degradation*, 1-26. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35691-0_1
- Batista-Santos, P., Duro, N., Rodrigues, A. P., Semedo, J. N., Alves, P., da Costa, M., Graça, I., Pais, I. P., Scotti-Campos, P., & Lidon, F. C. (2015). Is salt stress tolerance in *Casuarina glauca* Sieb. ex Spreng. associated with its nitrogen-fixing root-nodule symbiosis? An analysis at the photosynthetic level. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 97-109.
- Bech, J., Poschenrieder, C., Barceló, J., & Lansac, A. (2002). Plants from Mine Spoils in the South American Area as Potential Sources of Germplasm for Phytoremediation Technologies. *Acta Biotechnologica*, 22(1-2), 5-11. [https://doi.org/10.1002/1521-3846\(200205\)22:1/2%253C5::AID-ABIO5%253E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-3846(200205)22:1/2%253C5::AID-ABIO5%253E3.0.CO;2-B)

Références bibliographiques

- Begum, S., Rath, S. K., & Rath, C. C. (2022). Applications of microbial communities for the remediation of industrial and mining toxic metal waste: a review. *Geomicrobiology Journal*, 39(3-5), 282-293. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1991054>
- Bejaoui, Z., Albouchi, A., Lamhamedi, M. S., & El Aouni, M. H. (2008). Effet d'un assèchement édaphique sur la croissance, l'allocation de biomasse et les relations hydriques chez *Casuarina glauca*. *Botany*, 86(11), 1242-1251. <https://doi.org/10.1139/B08-069>
- Belle, G. N., Schoeman, Y., & Oberholster, P. J. (2024). Source to receptor : Assessing health risks from heavy metal exposure in mining soils. *Minerals*, 14(9), 858. <https://doi.org/10.3390/min14090858>
- Bello, M. O., Bello, O. M., & Ogbesejana, A. B. (2022). Bioremediation Potential of *Helianthus annuus*. In *Bioremediation and Phytoremediation Technologies in Sustainable Soil Management*, Apple Academic Press. 47-74.
- Bello, S., Nasiru, R., Garba, N. N., & Adeyemo, D. J. (2019). Carcinogenic and non-carcinogenic health risk assessment of heavy metals exposure from Shanono and Bagwai artisanal gold mines, Kano state, Nigeria. *Scientific African*, 6, e00197. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00197>
- Bellouche, M. A. (2016). Schéma hydrogéologique possible de la mine de Kerzet Youssef (Nord-Est Algerien). *Sciences & Technologie. D, Sciences de la terre*, 73-80
- Ben Aissa Wiem, Véronique, G., Ben Aissa Rania, Abdessalem, B. H. A., Said, T., & Ben Aissa Lassaad. (2023). Geochemistry and P-T Conditions of Hydrothermal Fluids Associated with Porphyry, Metasomatic and Epithermal Ore Deposits at Oued Belif-Ain El Araar Magmatic Structure (North-African Alpine Orogeny, Tunisia). *Geology of Ore Deposits*, 65(6), 625-643. <https://doi.org/10.1134/S1075701523060028>
- Ben Garali, A., Salah, S., Henchiri, M., & Srarfi, F. (2024). Assessment of heavy metals contamination/pollution of phosphogypsum waste of the Mdhilla region (Gafsa, southern Tunisia). *Environmental Monitoring and Assessment*, 196(12), 1204. <https://doi.org/10.1007/s10661-024-13383-7>
- Benhabyles, L., Djebbar, R., Lebrun, M., & Bourgerie, S. (2025). Metallic Pollution Around Reghaïa Lake : Tolerance Assessment of *Oxalis Pes-caprae* L. as Remediative Plant. *Water, Air, & Soil Pollution*, 236(5), 310. <https://doi.org/10.1007/s11270-025-07942-y>
- Benhabylès, L., Djebbar, R., Miard, F., Nandillon, R., Morabito, D., & Bourgerie, S. (2020). Biochar and compost effects on the remediative capacities of *Oxalis pes-caprae* L. growing on mining technosol polluted by Pb and As. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(24), 30133-30144. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08833-x>
- Bentellis, A., & Rached, O. (2025). Effects of metalloids and heavy metals on flora in a former antimony mine area. *Biologia*, 80(6), 1297-1306. <https://doi.org/10.1007/s11756-025-01910-x>
- Berthon, L., 1922. L'industrie minérale en Tunisie. Service des Mines de Tunisie. 272 pp.
- Bhattacharyya, P. N., Islam, N. F., Sarma, B., Nath, B. C., Al-Ani, L. K. T., & Lesueur, D. (2024). Frankia-actinorhizal symbiosis: a non-chemical biological assemblage for enhanced plant growth, nodulation and reclamation of degraded soils. *Symbiosis*, 92(1), 1-26. <https://doi.org/10.1007/s13199-023-00956-2>
- Bhuyan, S., Yadav, M., Giri, S. J., Begum, S., Das, S., Phukan, A., Priyadarshani, P., Sarkar, S., Jayswal, A., & Kabyashree, K. (2023). Microliter spotting and micro-colony observation : A rapid and simple approach for counting bacterial colony forming units. *Journal of Microbiological Methods*, 207, 106707. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106707>
- Bibi, M., Samiullah, F. B., & Saba Afzal, S. (2023). Essential and non-essential heavy metals sources and impacts on human health and plants. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 12(2), 835-847. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2023.120083>
- Bisht, A., Kamboj, N., Kamboj, V., & Bisht, A. (2020). A review on the role of emerging anthropogenic activities in environmental degradation and emphasis on their mitigation. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 5(3), 419-425. <https://doi.org/10.26832/24566632.2020.0503025>
- Bjørklund, G., Shanaida, M., Gontova, T., Gheorghe, E., Kassym, L., Kussainova, A., Voloshyn, V., Semenova, Y., Lysiuk, R., Voloshyn, O., Shanaida, V., & Hangan, T. (2025). Minerals and Trace Elements : Key Protectors of Skin Health and Defenders Against Skin Disorders. <https://doi.org/10.2174/0109298673348175250214054101>
- Blenis, N., Hue, N., Maaz, T. M., & Kantar, M. (2023). Biochar production, modification, and its uses in soil remediation: A review. *Sustainability*, 15(4), 3442. <https://doi.org/10.3390/su15043442>

Références bibliographiques

- Boi, M. E., Fois, M., Podda, L., Porceddu, M., & Bacchetta, G. (2023). Using Mediterranean Native Plants for the Phytoremediation of Mining Sites : An Overview of the Past and Present, and Perspectives for the Future. *Plants*, 12(22), 3823. <https://doi.org/10.3390/plants12223823>
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., ... & Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal (loid) s contaminated soils—to mobilize or to immobilize?. *Journal of hazardous materials*, 266, 141-166. <https://doi.org/10.26832/24566632.2020.0503025>
- Bora, J., Acharya, S., Mondal, S., Priya, S., Mishra, R., Malik, S., ... & Lata, S. (2024). Role of Microbes in Heavy Metal Bioremediation. In *Nanotechnology Applications and Innovations for Improved Soil Health* (pp. 354-379). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/979-8-3693-1471-5.ch018>
- Boros, K., Fortin, D., Jayawardene, I., Chénier, M., Levesque, C., & Rasmussen, P. E. (2017). Comparison of gastric versus gastrointestinal PBET extractions for estimating oral bioaccessibility of metals in house dust. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 92. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010092>
- Bortoloti, G. A., & Baron, D. (2022). Phytoremediation of toxic heavy metals by Brassica plants: A biochemical and physiological approach. *Environmental Advances*, 8, 100204. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100204>
- Bouaziz, S., Barrier, E., Soussi, M., Turki, M. M., & Zouari, H. (2002). Tectonic evolution of the northern African margin in Tunisia from paleostress data and sedimentary record. *Tectonophysics*, 357(1-4), 227-253. [https://doi.org/10.1016/S0040-1951\(02\)00370-0](https://doi.org/10.1016/S0040-1951(02)00370-0)
- Bouazza, M. K., Ighilharizn, Z., De Lajudie, P., Duponnois, R., & Bekki, A. (2015). Assessing the native arbuscular mycorrhizal symbioses to rehabilitate a degraded coastal sand dune in Algeria. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 8(2), 194-202.
- Bousbih, M., Lamhamedi, M. S., Abassi, M., Khasa, D. P., & Béjaoui, Z. (2023). Potential Use of Two Forest Species (*Salix alba* and *Casuarina glauca*) in the Rhizofiltration of Heavy-Metal-Contaminated Industrial Wastewater. *Forests*, 14(3), 654. <https://doi.org/10.3390/f14030654>
- Boussen, S., Sebei, A., Soubrand-Colin, M., Bril, H., Chaabani, F., & Abdeljaouad, S. (2010). Mobilization of lead-zinc rich particles from mine tailings in northern Tunisia by aeolian and run-off processes. *Bulletin de la Société Géologique de France*, 181(5), 459- 471. <https://doi.org/10.2113/gssgfbull.181.5.459>
- Bouzidi, W., Mezned, N., & Abdeljaouad, S. (2018). Hyperspectral reflectance Spectroscopy and X-ray diffraction for iron minerals characterization in northern Tunisia. *Earth resources and environmental remote sensing/GIS applications IX*, 10790, 426- 431. <https://doi.org/10.1117/12.2325635>.
- Bouzidi, W., Mezned, N., & Abdeljaouad, S. (2022). Mineralogical mapping using EO-1 Hyperion data for iron mine identification. *Journal of Applied Remote Sensing*, 16(2), 024514. <https://doi.org/10.1117/1.JRS.16.024514>
- Bouzidi, W., Mezned, N., & Abdeljaouad, S. (2020). Potential Of Hyperion Data And Hypersectral Reflectance Spectroscopy For The Characterization Of Fe Iron Ore Deposits In The Nappe Zone In Northern Tunisia. 2020 Mediterranean and Middle-East Geoscience and Remote Sensing Symposium (M2GARSS). doi: 10.1109/M2GARSS47143.2020.9105279
- Bouzidi, W., Mezned, N., & Abdeljaouad, S. (2020a). Potential Of Hyperion Data And Hypersectral Reflectance Spectroscopy For The Characterization Of Fe Iron Ore Deposits In The Nappe Zone In Northern Tunisia. 2020 Mediterranean and Middle-East Geoscience and Remote Sensing Symposium (M2GARSS), 152- 155.
- Bouzidi, W., Mezned, N., & Abdeljaouad, S. (2022). Mineralogical mapping using EO-1 Hyperion data for iron mine identification. *Journal of Applied Remote Sensing*, 16(2), 024514-024514. <https://doi.org/10.1117/1.JRS.16.024514>
- Bouzouada, R. (1992). Géologie, minéralogie et paragenèses des gites de fer du District des Nefza. Répartition des sulfures et des impuretés. DEA thesis, Tunis II University, 77p.
- Braga, L., Furia, E., Buldrini, F., & Mercuri, A. M. (2023). Pollen and Flora as Bioindicators in Assessing the Status of Polluted Sites : The Case Study of the Mantua Lakes (SIN “Laghi di Mantova e Polo Chimico”; N Italy). *Sustainability*, 15(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/su15129414>
- Braun-Blanquet, J. (1932). *Plant sociology. The study of plant communities.*
- Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G. L., & Schalk, I. J. (2010). Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), 419-425. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00126.x>

Références bibliographiques

- Briat, J. F. (1992). Iron assimilation storage in prokaryotes. *Microbiology*, 138(12), 2475-2483. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-12-2475>
- Brüggenwirth, L., Behrens, R., Schnee, L. S., Sauheitl, L., Mikutta, R., & Mikutta, C. (2024). Interactions of manganese oxides with natural dissolved organic matter : Implications for soil organic carbon cycling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 366, 182-200. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2023.12.016>
- Bu, C., Li, X., Li, Q., Li, L., & Wu, P. (2024). Spatiotemporal distributions, sources, and health risks of heavy metals in an acid mine drainage (AMD)-contaminated karst river in southwest China. *Applied Water Science*, 14(12), 251. <https://doi.org/10.1007/s13201-024-02317-w>
- Buccolieri, A., Buccolieri, G., Cardellicchio, N., Dell'Atti, A., Di Leo, A., & Maci, A. (2006). Heavy metals in marine sediments of Taranto Gulf (Ionian Sea, southern Italy). *Marine chemistry*, 99(1-4), 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2005.09.009>
- Budi, S. W., Van Tuinen, D., Arnould, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V., & Gianinazzi, S. (2000). Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology*, 15(2), 191-199. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00095-0](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00095-0)
- Bunditboondee, C., Lohwacharin, J., Khan, E., & Laohasurayotin, K. (2023). Performance of electrokinetic remediation system for mercury contaminated marine sediment: Roles of electrode spacing and electrode configuration. *Marine Pollution Bulletin*, 194, 115256. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115256>
- Burns, R. G. (1978). Enzymes activity in soil: some theoretical and practical considerations. Academic press, London, pp 295-340.
- Byrne, P., Onnis, P., Runkel, R. L., Frau, I., Lynch, S. F., & Edwards, P. (2020). Critical shifts in trace metal transport and remediation performance under future low river flows. *Environmental Science & Technology*, 54(24), 15742-15750. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04016>
- Cai, X., Yin, N., Liu, X., Wang, P., Du, H., Cui, Y., & Hu, Z. (2022). Biogeochemical processes of arsenic transformation and redistribution in contaminated soils : Combined effects of iron, sulfur, and organic matter. *Geoderma*, 422, 115948. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.115948>
- Callender, K. L., Roy, S., Khasa, D. P., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2016). Actinorhizal alder phytostabilization alters microbial community dynamics in gold mine waste rock from Northern Quebec: a greenhouse study. *PLoS One*, 11(2), e0150181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150181>
- Cannon, H. L., Connally, G. G., Epstein, J. B., Parker, J. G., Thornton, I., & Wixson, G. (1978). Rocks: geological sources of most trace elements. In report to the workshop at south seas plantation Captiva Island, FL, US. *Geochem Environ*, 3, pp. 17-31. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.018>
- Cano-Ortiz, A., Piñar Fuentes, J. C., Peña-Martínez, J., & Cano, E. (2024). Use of Edaphic Bioindicators to Mitigate Environmental Impact and Improve Agricultural Research and Training. *Soil Systems*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/soilsystems8040107>
- Cao, A., Cappai, G., Carucci, A., & Lai, T. (2008). Heavy metal bioavailability and chelate mobilization efficiency in an assisted phytoextraction process. *Environmental Geochemistry and Health*, 30, 115-119. <https://doi.org/10.1007/s10653-008-9136-2>
- Carrillo-González, R., Šimůnek, J., Sauvé, S., & Adriano, D. (2006). Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Advances in agronomy*, 91, 111-178. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(06\)91003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(06)91003-7)
- Casida Jr, L. E., Klein, D. A., & Santoro, T. (1964). Soil dehydrogenase activity. *Soil science*, 98(6), 371-376.
- Chae, Y., Cui, R., Kim, S. W., An, G., Jeong, S. W., & An, Y. J. (2017). Exoenzyme activity in contaminated soils before and after soil washing: β -glucosidase activity as a biological indicator of soil health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, 368-374. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.007>
- Chai, W., Wang, F., Miao, Z., & Che, N. (2024). Hydrophilic porous activated biochar with high specific surface area for efficient capacitive deionization. *Desalination and Water Treatment*, 320, 100617. <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100617>
- Chakrabarti, K., & Bhattacharyya, P. (2006). Influence of soil properties on fluorescein diacetate hydrolyzing activity under different agro-ecosystems: (Einfluss von Bodeneigenschaften auf die Hydrolyse von Fluoreszeindiacetat in unterschiedlichen Agro-Ökosystemen). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 52(4), 461-467. <https://doi.org/10.1080/03650340600612607>
- Chamkhi, I., El Omari, N., Balahbib, A., El Meniy, N., Benali, T., & Ghoulam, C. (2022). Is—the rhizosphere a source of applicable multi-beneficial microorganisms for plant enhancement?. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 1246-1259. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.032>

Références bibliographiques

- Chandran, H., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria as a green alternative for sustainable agriculture. *Sustainability*, 13(19), 10986. <https://doi.org/10.3390/su131910986>
- Charkiewicz, A. E., Omeljaniuk, W. J., Garley, M., & Nikliński, J. (2025). Mercury Exposure and Health Effects: What Do We Really Know?. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(5), 2326. <https://doi.org/10.3390/ijms26052326>
- Charzyński, P., Plak, A., & Hanaka, A. (2017). Influence of the soil sealing on the geoaccumulation index of heavy metals and various pollution factors. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), 4801-4811. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8209-5>
- Chaudhary, S., & Sindhu, S. S. (2024). Microbiome-mediated remediation of heavy metals: Impact on soil health, crop production, and ecosystem sustainability. In *Microbiome-assisted bioremediation* (pp. 257-312). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21911-5.00019-2>
- Chaudhary, S., Jain, V. P., & Jaiswar, G. (2022). The composition of polysaccharides: monosaccharides and binding, group decorating, polysaccharides chains. In *Innovation in nano-polysaccharides for eco-sustainability* Elsevier, 2022. 83-118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823439-6.00005-2>
- Chauhan, N., Singh, J., Krause, S., Dehbandi, R., Toor, A. P., Patnaik, R., & Srivastava, A. (2025). Identifying Sources of Heavy Metal Contamination in Soil and it's Implications on One Health. <https://doi.org/10.5194/egusphere-egu25-18612>
- Chen, C. J., Wu, M. M., Lee, S. S., Wang, J. D., Cheng, S. H., & Wu, H. Y. (1988). Atherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water. Multiple risk factors and related malignant neoplasms of blackfoot disease. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 8(5), 452-460. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.8.5.452>
- Chen, M., Wang, Y., Pan, J., Zhong, L., Qiao, M., Gao, C., ... & Wang, Y. (2025). Can N-Doped Biochar Achieve Safe Vegetable Production in Soil Heavily Contaminated by Heavy Metals?. *Toxics*, 13(2), 79. <https://doi.org/10.3390/toxics13020079>
- Chen, X., & Peng, Y. (2018). Managing clay minerals in froth flotation—A critical review. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 39(5), 289-307. <https://doi.org/10.1080/08827508.2018.1433175>
- Chen, Z., Kumar, A., Fu, Y., Singh, B. P., Ge, T., Tu, H., ... & Xu, J. (2021). Biochar decreased rhizodeposits stabilization via opposite effects on bacteria and fungi: diminished fungi-promoted aggregation and enhanced bacterial mineralization. *Biology and Fertility of Soils*, 57, 533-546. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01539-9>
- Chen, Z., Yang, Y., Zhou, L., Hou, H., Zhang, Y., Liang, J., & Zhang, S. (2022). Ecological restoration in mining areas in the context of the Belt and Road initiative: Capability and challenges. *Environmental Impact Assessment Review*, 95, 106767. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2022.106767>
- Cherif, H., Neifar, M., Chouchane, H., Soussi, A., Hamdi, C., Guesmi, A., ... & Cherif, A. (2018). Extremophile diversity and biotechnological potential from desert environments and saline systems of southern Tunisia. In *Extremophiles* (pp. 33-64). CRC Press.
- Chitara, M. K., Chauhan, S., & Singh, R. P. (2021). Bioremediation of polluted soil by using plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment: Volume 1*, 203-226. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7447-4_8
- Chowdhury, M. A. R., & Singer, D. M. (2023). Complex speciation and distribution of iron, sulfur, and trace metals in coal mine soils reflect grain-and sub-grain-scale heterogeneity during pyrite oxidative dissolution. *Soil Systems*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.3390/soilsystems8010002>
- Christensen, P. D., Toth, S. J., & Bear, F. E. (1951). The status of soil manganese as influenced by moisture, organic matter, and pH. DOI: 19521900498
- Ćirić, V., Prekop, N., Šeremešić, S., Vojnov, B., Pejić, B., Radovanović, D., & Marinković, D. (2023). The implication of cation exchange capacity (CEC) assessment for soil quality management and improvement. *Agriculture & Forestry/Poljoprivreda i šumarstv*, 69(4). doi:10.17707/AgricultForest.69.4.08
- Cleaver, A. E., Jamieson, H. E., Rickwood, C. J., & Huntsman, P. (2021). Tailings dust characterization and impacts on surface water chemistry at an abandoned Zn-Pb-Cu-Au-Ag deposit. *Applied Geochemistry*, 128, 104927. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104927>
- Clemente-Villalba, J., Burló, F., Hernández, F., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2024). Potential interest of *Oxalis pes-caprae* L., a wild edible plant, for the food and pharmaceutical industries. *Foods*, 13(6), 858. <https://doi.org/10.3390/foods13060858>
- Clevenger, T. E. (1990). Use of sequential extraction to evaluate the heavy metals in mining wastes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 50, 241-254. <https://doi.org/10.1007/BF00280626>

Références bibliographiques

- Clough, R., Harrington, C. F., Hill, S. J., Madrid, Y., & Tyson, J. F. (2022). Atomic Spectrometry Update: review of advances in elemental speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 37(7), 1387-1430. <https://doi.org/10.1039/D2JA90029G>
- Colombini, G., Auclerc, A., & Watteau, F. (2023). Technogenic parent materials drive Technosols humus system formation on an industrial brownfield. *Catena*, 233, 107469. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2023.107469>
- Colombini, G., Watteau, F., & Auclerc, A. (2022). Technosol rehabilitation strategies drive soil physico-chemical properties and fauna diversity on a former coking plant area. *Applied Soil Ecology*, 177, 104542. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104542>
- Condron, L. M., Turner, B. L., & Cade-Menun, B. J. (2005). Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. *Phosphorus: agriculture and the environment*, 46, 87-121. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr46.c4>
- Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2018). The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. *Environmental pollution*, 240, 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.119>
- Couic, E., Grimaldi, M., Alphonse, V., Balland-Bolou-Bi, C., Livet, A., Giusti-Miller, S., ... & Bousserhine, N. (2018). Mercury behaviour and C, N, and P biogeochemical cycles during ecological restoration processes of old mining sites in French Guiana. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(4), 657-672. <https://doi.org/10.1039/C8EM00016F>
- Cui, J., Jiang, J., Chang, E., Zhang, F., Guo, L., Fang, D., ... & Wang, Y. (2023b). Underlying reasons and factors associated with changes in earthworm activities in response to biochar amendment: a review. *Biochar*, 5(1), 79. <https://doi.org/10.1007/s42773-023-00287-x>
- Cui, W., Li, X., Duan, W., Xie, M., & Dong, X. (2023a). Heavy metal stabilization remediation in polluted soils with stabilizing materials: a review. *Environmental geochemistry and health*, 45(7), 4127-4163. <https://doi.org/10.1007/s10653-023-01522-x>
- Cui, Y., Wang, X., Wang, X., Zhang, X., & Fang, L. (2021). Evaluation methods of heavy metal pollution in soils based on enzyme activities: A review. *Soil Ecology Letters*, 3(3), 169-177. <https://doi.org/10.1007/s42832-021-0096-0>
- Dahnoun, K., Djadouni, F., Essghaier, B., Naccache, C., Zitouna, N., Zehdi-Azouzi, S., Bayyig̃iT, İs., Latif, H. R., Mezghani-Khemakhem, M., & Bourguiba, H. (2024). Characterization and bioremediation potential of heavy-metal resistant bacteria isolated from agricultural soil. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 48(4), 607-617. <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3205>
- Dai, J., Xu, Z., Yang, N., Tuerxunjiang, H., Shan, X., Diao, Y., ... & Pei, J. (2024). Investigation of the biocontrol mechanism of a novel *Pseudomonas* species against phytopathogenic *Fusarium graminearum* revealed by multi-omics integration analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(6), e00455-24. <https://doi.org/10.1128/aem.00455-24>
- Dai, Z., Xiong, X., Zhu, H., Xu, H., Leng, P., Li, J., Tang, C., & Xu, J. (2021). Association of biochar properties with changes in soil bacterial, fungal and fauna communities and nutrient cycling processes. *Biochar*, 3(3), 239-254. <https://doi.org/10.1007/s42773-021-00099-x>
- Danala D. S., Ekengele Nga, L., Tiki, D., Mamdem, L. E., Djangue Moustapha, B., Ibrahim, B. A., Hamadou, A., Sounya, J. B., Ndi, P. C., & Bitom, D. L. (2025). Speciation and bioavailability of potentially toxic element in soils and sediments of mining areas in Meiganga Adamawa plateau (Cameroon). *Environmental Geochemistry and Health*, 47(9), 398. <https://doi.org/10.1007/s10653-025-02716-1>
- Das, M., & Semy, K. (2023). Monitoring the dynamics of acid mine drainage affected stream surface water hydrochemistry at Jaintia Hills, Meghalaya, India. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(30), 75489-75499. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27606-w>
- Das, N., Tirunagari, P., & Maiti, M. K. (2022). Plant Metal Tolerance Proteins : Insight into Their Roles in Metal Transport and Homeostasis for Future Biotechnological Applications. In K. Kumar & S. Srivastava (Éds.), *Plant Metal and Metalloid Transporters* (p. 289-304). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-6103-8_14
- Das, S. K., & Varma, A. (2010). Role of enzymes in maintaining soil health. In *Soil enzymology*, . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 25-42. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_2
- David, M., Krishna, P. M., & Sangeetha, J. (2016). Elucidation of impact of heavy metal pollution on soil bacterial growth and extracellular polymeric substances flexibility. *3 Biotech*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.1007/S13205-016-0475-X>

Références bibliographiques

- Dawson, J. O., & Klemp, M. T. (1987, February). Variation in the capacity of black alder to nodulate in central Illinois soils. In Central Hardwood Forest Conference VI, Knoxville, Tenn (pp. 24-26)
- de Campos, A. K. R., Cavalieri-Polizeli, K. M. V., & Melo, V. de F. (2020). Effects of compaction on lead availability in contaminated soils with contrasting texture. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(11), 672. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08648-w>
- de Oliveira, J. D., de Oliveira Nascimento, I., Cunha, W. L., & de Sousa, H. S. (2024). *Pseudomonas* sp. Bacteria : Potentially toxic metal-contaminated soil remediation potentials-minimum inhibitory concentration investigation and application. *Cuadernos de Educación y Desarrollo*, 16(2), e3341-e3341. <https://doi.org/10.55905/cuadv16n2-031>
- De Santis, A., Bevilacqua, A., Racioppo, A., Speranza, B., Corbo, M. R., Altieri, C., & Sinigaglia, M. (2025). A Preliminary Investigation into Heavy Metal Tolerance in *Pseudomonas* Isolates : Does the Isolation Site Have an Effect? *Agriculture*, 15(15), 1692. <https://doi.org/10.3390/agriculture15151692>
- Debez, I. B. S., Alaya, A. B., Karkouch, I., Khiari, B., Garcia-Caparrós, P., Alyami, N. M., ... & Djébalí, N. (2024). In vitro and in vivo antifungal efficacy of individual and consortium *Bacillus* strains in controlling potato black scurf and possible development of spore-based fungicide. *Biological Control*, 193, 105527. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105527>
- Decrée, S., De Putter, T., Yans, J., Moussi, B., Recourt, P., Jamoussi, F., ... & Dupuis, C. (2008b). Iron mineralisation in Mio-Pliocene sediments of the Tamra iron mine (Nefza mining district, Tunisia): Mixed influence of pedogenesis and hydrothermal alteration. *Ore Geology Reviews*, 33(3-4), 397-410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oregeorev.2007.02.001>
- Decrée, S., Marignac, C., De Putter, T., Deloule, E., Liégeois, J. P., & Demaiffe, D. (2008a). Pb–Zn mineralization in a Miocene regional extensional context: the case of the Sidi Driss and the Douahria ore deposits (Nefza mining district, northern Tunisia). *Ore Geology Reviews*, 34(3), 285-303. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2008.01.002>
- Decrée, S., Marignac, C., De Putter, T., Yans, J., Clauer, N., Dermech, M., Aloui, K., & Baele, J.-M. (2013). The Oued Belif Hematite-Rich Breccia : A Miocene Iron Oxide Cu-Au-(U-REE) Deposit in the Nefza Mining District, Tunisia. *Economic Geology*, 108(6), 1425-1457. <https://doi.org/10.2113/econgeo.108.6.1425>
- Decrée, S., Ruffet, G., De Putter, T., Baele, J. M., Recourt, P., Jamoussi, F., & Yans, J. (2010). Mn oxides as efficient traps for metal pollutants in a polyphase low-temperature Pliocene environment: A case study in the Tamra iron mine, Nefza mining district, Tunisia. *Journal of African Earth Sciences*, 57(3), 249-261. [doi:10.1016/j.jafrearsci.2009.08.005](https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2009.08.005)
- Decrée, S., Van Ham-Meert, A., Baele, J.-M., Namur, O., Deloule, E., & Marignac, C. (2023). Irish-type deposits in Tunisia : A new perspective to assign the Pb-Zn deposits of the Nefza District. <https://doi.org/10.61153/DQCN2038>
- Dehkordi, M. M., Nodeh, Z. P., Dehkordi, K. S., Khorjistan, R. R., & Ghaffarzadeh, M. (2024). Soil, air, and water pollution from mining and industrial activities : Sources of pollution, environmental impacts, and prevention and control methods. *Results in Engineering*, 23, 102729. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.102729>
- Dekoninck, A., Moussi, B., Vennemann, T., Jamoussi, F., Mattielli, N., Decrée, S., Chaftar, H.-R., Hatira, N., & Yans, J. (2018). Mixed hydrothermal and meteoric fluids evidenced by unusual H-and O-isotope compositions of kaolinite-halloysite in the Fe (-Mn) Tamra deposit (Nefza district, NW Tunisia). *Applied Clay Science*, 163, 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.07.007>
- Deng, J., Yu, J., Wang, X., Yu, D., Ma, H., Wu, Y., Yu, C., & Pu, S. (2024). Spatial distribution and migration characteristics of heavy metals at an abandoned industrial site in the Southwest of China. *Journal of Hazardous Materials*, 480, 136447. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136447>
- Department of Environmental Affairs (DEA). *The Framework for the Management of Contaminated Land*, South Africa. 2010.
- Dermech, M. N. (1990). *Le complexe de l'Oued Bélif-Sidi Driss (Tunisie septentrionale): hydrothermalisme et métallogénie* (Doctoral dissertation, Paris 7).
- Dey, S., Tripathy, B., Kumar, M. S., & Das, A. P. (2023). Ecotoxicological consequences of manganese mining pollutants and their biological remediation. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 5, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2023.01.001>

Références bibliographiques

- Diagne, N., Arumugam, K., Ngom, M., Nambiar-Veetil, M., Franche, C., Narayanan, K. K., & Laplaze, L. (2013). Use of Frankia and actinorhizal plants for degraded lands reclamation. *BioMed research international*, 2013(1), 948258. <https://doi.org/10.1155/2013/948258>
- Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P. I., Ngom, D., Ndour, B., Cissokho, M., ... & Champion, A. (2015). Remediation of heavy metal-contaminated soils and enhancement of their fertility with actinorhizal plants. *Heavy Metal Contamination of Soils: Monitoring and Remediation*, 355-366. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14526-6_19
- Diami, S., Mohd Kusin, F., & Madzin, Z. (2016). Potential ecological and human health risks of heavy metals in surface soils associated with iron ore mining in Pahang, Malaysia. *Environmental Science and Pollution Research*, 23. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7314-9>
- Dick, R. P. (1994). Soil enzyme activities as indicators of soil quality. Defining soil quality for a sustainable environment, 35, 107-124. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c7>
- Dick, W. A., Cheng, L., & Wang, P. J. S. B. (2000). Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13), 1915-1919. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00166-8)
- Dima, C., Assadpour, E., Dima, S., & Jafari, S. M. (2020). Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2862-2884. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12623>
- Diquattro, S., Pinna, M. V., Garau, M., Pulina, A., Obinu, L., Porceddu, A., ... & Garau, G. (2024). Valuable non-food crops for biochar-assisted phytoremediation of contaminated soils: the case of cardoon, rapeseed and safflower. *Applied Soil Ecology*, 198, 105349. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2024.105349>
- Djade, P. J. O., Traore, A., Koffi, K. J. T., Keumean, K. N., & Soro, G. (2020). Evaluation du niveau de contamination des eaux souterraines par les éléments traces métalliques dans le département de Zouan-Hounien (Ouest de la Côte d'Ivoire). : Assessment of pollution indices by metallic trace elements of groundwater resources in the mining area of the department of Zouan-Hounien, Côte d' Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 150(1), 15457 - 15468.
- Dong, L., Fu, C., Liu, J., & Wang, Y. (2018). Disturbances of Temperature-Depth Profiles by Surface Warming and Groundwater Flow Convection in Kumamoto Plain, Japan. *Geofluids*, 2018, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2018/8451276>
- Dörken, V. M., Parsons, R. F., & Ladd, P. G. (2018). The foliar change from seedlings to adults in *Allocasuarina* (Casuarinaceae): the evolutionary and ecological aspects of leaf reduction, xeromorphy and scleromorphy. *Feddes Repertorium*, 129(3), 193-222. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1535-5>
- Doumas, P., Munoz, M., Banni, M., Becerra, S., Bruneel, O., Casiot, C., ... & Sappin-Didier, V. (2018). Polymetallic pollution from abandoned mines in Mediterranean regions: a multidisciplinary approach to environmental risks. *Regional environmental change*, 18, 677-692. <https://doi.org/10.1007/S10113-016-0939-X>
- D'Souza, R., & Paul, M. S. (2014). Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. *Environmental risk assessment of soil contamination*, 485. <http://dx.doi.org/10.5772/57469>
- Durand, M., Le Guyader, N., Gervais, J., Czarnes, S., & Pommier, T. (2024). N-microbial properties are key indicators of fertility in maturing technosols constructed for urban landscapes. *Ecological Indicators*, 166, 112563. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2024.112563>
- Ebengue Atega, P. L., Vinches, M., Casiot, C., & Pistre, S. (2022). Development and implementation of a multi-criteria aggregation operator to estimate the contributions of the natural geochemical background and anthropogenic inputs in groundwater in former mining regions : An application to arsenic and antimony in the Gardon river watershed (southern France). *Science of The Total Environment*, 814, 151936. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151936>
- Edet, A. E., & Offiong, O. E. (2002). Evaluation of water quality pollution indices for heavy metal contamination monitoring. A study case from Akpabuyo-Odukpani area, Lower Cross River Basin (southeastern Nigeria). *GeoJournal*, 57(4), 295 - 304. <https://doi.org/10.1023/B:GEJO.0000007250.92458.de>
- Edo, G. I., Samuel, P. O., Oloni, G. O., Ezekiel, G. O., Ikpekor, V. O., Obasohan, P., Ongulu, J., Otunuya, C. F., Opiti, A. R., Ajakaye, R. S., Essaghah, A. E. A., & Agbo, J. J. (2024). Environmental persistence, bioaccumulation, and ecotoxicology of heavy metals. *Chemistry and Ecology*, 40(3), 322-349. <https://doi.org/10.1080/02757540.2024.2306839>

Références bibliographiques

- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in microbiology*, 8, 2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Egli, M., Nater, M., Mirabella, A., Raimondi, S., Plötze, M., & Alioth, L. (2008). Clay minerals, oxyhydroxide formation, element leaching and humus development in volcanic soils. *Geoderma*, 143(1-2), 101-114. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.10.020>
- El Mokni, R., Iamónico, D., Véla, E., Verloove, F., & Domina, G. (2022). New records of Asteraceae for the non-native flora of Tunisia and north Africa with some nomenclatural remarks. *Mediterranean Botany*, 43.
- El Rasafi, T., Nouri, M., & Haddioui, A. (2021). Metals in mine wastes: environmental pollution and soil remediation approaches—a review. *Geosystem Engineering*, 24(3), 157-172. <http://dx.doi.org/10.1080/12269328.2017.1400474>
- Ellenberg, D., & Mueller-Dombois, D. (1974). *Aims and methods of vegetation ecology* (Vol. 547). Wiley New York.
- Elmayel, I., Esbrí, J. M., Efrén, G.-O., García-Noguero, E.-M., Elouear, Z., Jalel, B., Farieri, A., Roqueñí, N., Cienfuegos, P., & Higuera, P. (2020). Evolution of the speciation and mobility of Pb, Zn and Cd in relation to transport processes in a mining environment. *International journal of environmental research and public health*, 17(14), 4912. <https://doi.org/10.3390/ijerph17144912>
- Elmayel, I., Higuera, P. L., Bouzid, J., Garcia Noguero, E. M., & Elouaer, Z. (2019). Heavy Metals Distribution in Soils of an Agricultural Area Impacted by Former Mining Activities: Case of Trozza Mine, Tunisia. In *Recent Advances in Geo-Environmental Engineering, Geomechanics and Geotechnics, and Geohazards: Proceedings of the 1st Springer Conference of the Arabian Journal of Geosciences (CAJG-1), Tunisia 2018* (pp. 33-36). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01665-4_8
- Elouear, Z., Bouhamed, F., Boujelben, N., & Bouzid, J. (2016). Assessment of toxic metals dispersed from improperly disposed tailing, Jebel Ressas mine, NE Tunisia. *Environmental Earth Sciences*, 75, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-5035-x>
- Environnement France. (2023). Principe des essais de bioaccessibilité.
- Enya, O., Heaney, N., Iniama, G., & Lin, C. (2020). Effects of heavy metals on organic matter decomposition in inundated soils: Microcosm experiment and field examination. *Science of the total environment*, 724, 138223. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138223>
- Essefi, E. (2021). Geoeconomic interest versus environmental and health issues of the mineralogical assemblage of sebkha Oum El Khialate, southeastern Tunisia. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(6), 5835-5845.
- Fabbri, D., Pizzol, R., Calza, P., Malandrino, M., Gaggero, E., Padoan, E., & Ajmone-Marsan, F. (2021). Constructed technosols: A strategy toward a circular economy. *Applied Sciences*, 11(8), 3432. <https://doi.org/10.3390/app11083432>
- Fakhar, A., Gul, B., Gurmani, A., Khan, S., Ali, S., Sultan, T., Chaudhary, H., Rafique, M., & Rizwan, M. (2020). Heavy metal remediation and resistance mechanism of *Aeromonas*, *Bacillus*, and *Pseudomonas* : A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1863112>
- Fan, T.-T., Wang, Y.-J., Li, C.-B., He, J.-Z., Gao, J., Zhou, D.-M., Friedman, S. P., & Sparks, D. L. (2016). Effect of Organic Matter on Sorption of Zn on Soil : Elucidation by Wien Effect Measurements and EXAFS Spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 50(6), 2931-2937. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05281>
- Fang, H., Zhou, C., Guan, D. X., Azeem, M., & Li, G. (2025). Synergistic Approaches for Sustainable Remediation of Organic Contaminated Soils: Integrating Biochar and Phytoremediation. *Agriculture*, 15(8), 905. <https://doi.org/10.3390/agriculture15080905>
- FAO. (1972). *Soils Bulletin: Trace Elements in Soils and Agriculture*.
- Fasani, E., Li, M., Varotto, C., Furini, A., & DalCorso, G. (2022). Metal Detoxification in Land Plants : From Bryophytes to Vascular Plants. *STATE of the Art and Opportunities*. *Plants*, 11(3), 237. <https://doi.org/10.3390/plants11030237>
- Fatah, H. R., & Sadiq, T. F. (2025). Phytoavailability and Mobility of Heavy Metals in Oil Refinery-Polluted Soil Amended with Olive Waste Biochar and Maize (*Zea mays* L.) Cultivation. *Passer Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 295-303. DOI:10.24271/psr.2025.514926.2059
- Fazekášová, D., & Fazekáš, J. (2020). Soil quality and heavy metal pollution assessment of iron ore mines in Nizna Slana (Slovakia). *Sustainability*, 12(6), 2549. <https://doi.org/10.3390/su12062549>

Références bibliographiques

- Feketeová, Z., Hrabovský, A., & Šimkovic, I. (2021). Microbial features indicating the recovery of soil ecosystem strongly affected by mining and ore processing. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(6), 3240. <https://doi.org/10.3390/ijerph18063240>
- Feng XiongHan, F. X., Zhai LiMei, Z. L., Tan WenFeng, T. W., Liu Fan, L. F., & He JiZheng, H. J. (2007). Adsorption and redox reactions of heavy metals on synthesized Mn oxide minerals. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.05.028>
- Ferjani, A. B., Burolet, P. F., & Mejri, F. (1990). *Petroleum geology of Tunisia* (p. 194). Enterprise tunisienne d'activités pétrolières.
- Fernandes, C. B. C., Ferreira Mendes, K., Dias Júnior, A. F., da Silva Caldeira, V. P., da Silva Teófilo, T. M., Severo Silva, T., Mendonça, V., de Freitas Souza, M., & Valadão Silva, D. (2020). Impact of pyrolysis temperature on the properties of eucalyptus wood-derived biochar. *Materials*, 13(24), 5841. <https://doi.org/10.3390/ma13245841>
- Ferreira F, M. P., De Matos, A. T., Da Costa, L. M., & Lima Neves, J. C. (2000). Competitive adsorption of zinc, cadmium, copper, and lead in three highly-weathered Brazilian soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(17-18), 2939-2958. <https://doi.org/10.1080/00103620009370640>
- Follmer, C. (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69(1), 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.034>
- Forstner, U. (1981). Trace metals in fresh waters (with particular reference to mine effluents). *Regional and Specific Deposits*, 271-303.
- Franco, A. A., Campello, E. F. C., Dias, L. E., & de Farla, S. M. (1995). Revegetation of acidic residues from bauxite mining using nodulated and mycorrhizal legume trees. *Nitrogen Fixing Trees for Acid Soils*. Evans DO & LT Szott, Ed. Winrock International, Morrilton, 313-320
- Frankenberger Jr, W. T., & Johanson, J. B. (1982). Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 433-437. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90101-8)
- Freeman, J. L., & Banuelos, G. S. (2011). Selection of salt and boron tolerant selenium hyperaccumulator *Stanleya pinnata* genotypes and characterization of Se phytoremediation from agricultural drainage sediments. *Environmental science & technology*, 45(22), 9703-9710. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07063-1_18
- Fryzova, R., Pohanka, M., Martinkova, P., Cihlarova, H., Brtnicky, M., Hladky, J., & Kynicky, J. (2018). Oxidative stress and heavy metals in plants. *Reviews of environmental contamination and toxicology volume 245*, 129-156. https://doi.org/10.1007/398_2017_7
- Fulke, A. B., Ratanpal, S., & Sonker, S. (2024). Understanding heavy metal toxicity: Implications on human health, marine ecosystems and bioremediation strategies. *Marine Pollution Bulletin*, 206, 116707. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116707>
- Furnholm, T. R., & Tisa, L. S. (2014). The ins and outs of metal homeostasis by the root nodule actinobacterium *Frankia*. *BMC genomics*, 15, 1-19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1092>
- Galal, T. M., Gharib, F. A., Ghazi, S. M., & Mansour, K. H. (2017). Phytostabilization of heavy metals by the emergent macrophyte *Vossia cuspidata* (Roxb.) Griff.: a phytoremediation approach. *International journal of phytoremediation*, 19(11), 992-999. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1303816>
- Gao, H., Jian, X., Chang, J., Wang, D., Zhao, Z., & Bilan, Y. (2004). Effects of root exudates in the bioremediation of contaminated soils. *Chinese Journal of Ecology*, (4), 13
- Garcia-Gil, J. C., Plaza, C., Soler-Rovira, P., & Polo, A. (2000). Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biology and biochemistry*, 32(13), 1907-1913. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00165-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00165-6)
- Garcia-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M. B., & Carreira, J. A. (2008). Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2137-2145. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.023>
- Gascó, G., Cely, P., Paz-Ferreiro, J., Plaza, C., & Méndez, A. (2016). Relation between biochar properties and effects on seed germination and plant development. *Biological Agriculture & Horticulture*, 32(4), 237-247. <https://doi.org/10.1080/01448765.2016.1166348>
- Gazaryan, I. G., & Egorov, A. M. (1996). Modern enzymology of plant peroxidases. In *Advances in Molecular and Cell Biology* (Vol. 15, pp. 59-68). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(08\)60299-4](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(08)60299-4)
- Gęca, M., Khalil, A. M., Tang, M., Bhakta, A. K., Snoussi, Y., Nowicki, P., ... & Chehimi, M. M. (2023). Surface treatment of biochar—methods, surface analysis and potential applications: a comprehensive review. *Surfaces*, 6(2), 179-213. <https://doi.org/10.3390/surfaces6020013>

Références bibliographiques

- Geisseler, D., Horwath, W. R., Joergensen, R. G., & Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2058-2067. doi:10.1016/j.soilbio.2010.08.021
- Geng, Y., Pan, S., Zhang, L., Qiu, J., He, K., Gao, H., ... & Tian, D. (2022). Phosphorus biogeochemistry regulated by carbonates in soil. *Environmental Research*, 214, 113894. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113894>
- Genova, G., Borruso, L., Signorini, M., Mitterer, M., Niedrist, G., Cesco, S., Felderer, B., Cavani, L., & Mimmo, T. (2024). Analyzing soil enzymes to assess soil quality parameters in long-term copper accumulation through a machine learning approach. *Applied Soil Ecology*, 195, 105261. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105261>
- Ghazouani, S., Béjaoui, Z., Michael, P., Spiers, G., Beckett, P., Gtari, M., & Nkongolo, K. (2020). Rhizobioaugmentation of *Casuarina glauca* with N-fixing actinobacteria *Frankia* decreases enzymatic activities in wastewater irrigated soil: effects of *Frankia* on *C. glauca* growth. *Ecotoxicology*, 29, 417-428. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02187-3>
- Ghazouani, S., Béjaoui, Z., Spiers, G., Beckett, P., Gtari, M., & Nkongolo, K. (2020). Effects of Rhizobioaugmentation with N-Fixing Actinobacteria *Frankia* on Metal Mobility in *Casuarina glauca*-Soil System Irrigated with Industrial Wastewater : High Level of Metal Exclusion of *C. glauca*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(8). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04783-9>
- Ghorbel, M. (2012). Contamination métallique issue des déchets de l'ancien site minier de Jbel Ressas. Modélisation des mécanismes de transfert et conception des cartes d'alea post-mine dans un contexte carbonate sous un climat semi-aride évaluation du risque pour la santé humaine. Université de Toulouse.
- Ghorbel, M., Munoz, M., Courjault-Radé, P., Destrigneville, C., de Parseval, P., Souissi, R., Souissi, F., Ben Mammou, A., & Abdeljaouad, S. (2010). Health risk assessment for human exposure by direct ingestion of Pb, Cd, Zn bearing dust in the former miners' village of Jebel Ressas (NE Tunisia). *European Journal of Mineralogy*, 22, 639-649. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2010/0022-2037>
- Gibert, O., Valderrama, C., Martínez, M. M., Darbra, R. M., Moncunill, J. O., & Martí, V. (2021). Hydroxyapatite coatings on calcite powder for the removal of heavy metals from contaminated water. *Water*, 13(11), 1493. <https://doi.org/10.3390/w13111493>
- Glick, B. R., & Nascimento, F. X. (2021). *Pseudomonas* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase and its role in beneficial plant-microbe interactions. *Microorganisms*, 9(12), 2467. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122467>
- Goncharuk, E. A., & Zagorskina, N. V. (2023). Heavy Metals, Their Phytotoxicity, and the Role of Phenolic Antioxidants in Plant Stress Responses with Focus on Cadmium : Review. *Molecules*, 28(9), 3921. <https://doi.org/10.3390/molecules28093921>
- Gong, W. J., Niu, Z. F., Wang, X. R., & Zhao, H. P. (2021). How the soil microbial communities and activities respond to long-term heavy metal contamination in electroplating contaminated site. *Microorganisms*, 9(2), 362. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020362>
- Good, S. R., Harris, A. R., Crouch, P., Gowan, C. T., Shuster, W. D., & McElmurry, S. P. (2024). Lead bioaccessibility and commonly measured soil characteristics in Detroit, Michigan. *Applied Geochemistry*, 166, 105978. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2024.105978>
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192-195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- Gorovtsov, A. V., Minkina, T. M., Mandzhieva, S. S., Perelomov, L. V., Soja, G., Zamulina, I. V., Rajput, V. D., Sushkova, S. N., Mohan, D., & Yao, J. (2020). The mechanisms of biochar interactions with microorganisms in soil. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(8), 2495-2518. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00412-5>
- Gottis, C. (1952). Les gisements de fer en Tunisie. In *Symposium sur les gisements du fer du monde* (Vol. 1, pp. ???
- Govarthan, M., Mythili, R., Selvakumar, T., Kamala-Kannan, S., Rajasekar, A., & Chang, Y.-C. (2016). Bioremediation of heavy metals using an endophytic bacterium *Paenibacillus* sp. RM isolated from the roots of *Tridax procumbens*. *3 Biotech*, 6(2), 242. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0560-1>
- Green, V. S., Stott, D. E., & Diack, M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4), 693-701. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020>
- Gregory, P. J. (2022). RUSSELL REVIEW Are plant roots only “in” soil or are they “of” it? Roots, soil formation and function. *European Journal of Soil Science*, 73(1), e13219. <https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.1111/ejss.13219>

Références bibliographiques

- Griggs, J. L., Thomas, D. J., Fry, R., & Bradham, K. D. (2021). Improving the predictive value of bioaccessibility assays and their use to provide mechanistic insights into bioavailability for toxic metals/metalloids—A research prospectus. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 24(7), 307-324. doi:10.1080/10937404.2021.1934764
- Guarino, F., Miranda, A., Castiglione, S., & Ciccattelli, A. (2020). Arsenic phytovolatilization and epigenetic modifications in *Arundo donax* L. assisted by a PGPR consortium. *Chemosphere*, 251, 126310. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126310
- Guin, M., Singh, N., & De, A. (2025). Clay and clay minerals: A brief review from fundamentals to applications. *Zastita Materijala*. https://doi.org/10.62638/ZasMat1138
- Guo, G., Zhang, D., & Wang, Y. (2021). Characteristics of heavy metals in size-fractionated atmospheric particulate matters and associated health risk assessment based on the respiratory deposition. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(1), 285-299. https://doi.org/10.1007/s10653-020-00706-z
- Gupta, A., Rai, S., Bano, A., Sharma, S., Kumar, M., Binsuwaidan, R., ... & Pathak, N. (2022). ACC deaminase produced by PGPR mitigates the adverse effect of osmotic and salinity stresses in *Pisum sativum* through modulating the antioxidants activities. *Plants*, 11(24), 3419. https://doi.org/10.3390/plants11243419
- Gupta, S., & Pandey, S. (2023). Plant growth promoting rhizobacteria to mitigate biotic and abiotic stress in plants. *Sustainable Agriculture Reviews 60: Microbial Processes in Agriculture*, 47-68. https://doi.org/10.1007/978-3-031-24181-9_3
- Ha, T., Lam, T., Huyen, N., & Canh, N. (2018). Characterization and identification of nitrogenfixing bacteria isolated from agricultural soil. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 60, 48-54. https://doi.org/10.31276/VJSTE.60(3).48
- Hachani, C., Lamhamedi, MS., Abassi, M., Sleimi, N., & Béjaoui, Z. (2022). Effects of Heavy Metal-Polluted Soil (Pb, Zn, and Cd) on Seed Emergence, Seedling Growth, and Antioxidant Activity in Four Fabaceae Species. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(7), 263. https://doi.org/10.1007/s11270-022-05725-3
- Haider, F. U., Wang, X., Zulfiqar, U., Farooq, M., Hussain, S., Mehmood, T., ... & Mustafa, A. (2022). Biochar application for remediation of organic toxic pollutants in contaminated soils; An update. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 248, 114322. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114322
- Haile, M., Birhane, E., Gebresamuel, G., Adaramola, M. S., & Rannestad, M. M. (2024). Application of biochar derived from expansive shrubs and limestone improved acidic soil characteristics. *Carbon Management*, 15(1), 2364784. https://doi.org/10.1080/17583004.2024.2364784
- Hamdani, Z. F. (2020). *Nutrition minérale et maladies physiologiques des plantes*. 81pp.
- Hamed, Y., Gentilucci, M., Mokadem, N., Khalil, R., Ayadi, Y., Hadji, R., & Elaloui, E. (2024). Assessment and mitigation of groundwater contamination from phosphate mining in Tunisia: geochemical and radiological analysis. *Hydrology*, 11(6), 84. https://doi.org/10.3390/hydrology11060084
- Hammond, C. M., Root, R. A., Maier, R. M., & Chorover, J. (2022). Metal Lability and Mass Transfer Response to Direct-Planting Phytostabilization of Pyritic Mine Tailings. *Minerals*, 12(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/min12060757
- Han, J., Wu, D., Yang, J., Shi, Y., Abid, G., Wang, L., & Li, Z. (2024). A biochar-based amendment improved cadmium (Cd) immobilization, reduced its bioaccumulation, and increased rice yield. *Frontiers in Environmental Science*, 12, 1487190. https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1487190
- Han, L., Fan, Y., Chen, R., Zhai, Y., Liu, Z., Zhao, Y., Li, R., & Xia, L. (2023). Probabilistic Risk Assessment of Heavy Metals in Mining Soils Based on Fractions : A Case Study in Southern Shaanxi, China. *Toxics*, 11(12), 997. https://doi.org/10.3390/toxics11120997
- Han, X., Cui, L., & Yan, J. (2022). Effects of biochar on purslane-mediated transfer and uptake of soil bioavailable cadmium. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(12), 479. https://doi.org/10.1007/s11270-022-05952-8
- Hao, Y., Miao, X., Liu, H., & Miao, D. (2021). The variation of heavy metals bioavailability in sediments of Liujiang River Basin, SW China associated to their speciations and environmental fluctuations, a field study in typical karstic river. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(8), 3986. https://doi.org/10.3390/ijerph18083986
- Harun, F. A., Yakasai, H. M., Jagaba, A. H., Usman, S., Umar, H. A., & Shukor, M. Y. (2024). Bioremediation potential of *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. novel lead-resistant isolates : Identification, characterization, and optimization studies. *The Microbe*, 3, 100087. https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100087
- Hasan, M., Chakma, S., Liang, X., Sutradhar, S., Kozinski, J., & Kang, K. (2024). Engineered Biochar for Metal Recycling and Repurposed Applications. *Energies*, 17(18), 4674. https://doi.org/10.3390/en17184674

Références bibliographiques

- Hashim, M., Arif, H., Tabassum, B., Rehman, S., Bajaj, P., Sirohi, R., & Khan, M. F. A. (2024). An overview of the ameliorative efficacy of *Catharanthus roseus* extract against Cd²⁺ toxicity : Implications for human health and remediation strategies. *Frontiers in Public Health*, 12, 1327611.
- Hassan, S. H., Chafik, Y., Sena-Velez, M., Lebrun, M., Scippa, G. S., Bourgerie, S., ... & Morabito, D. (2023). Importance of application rates of compost and biochar on soil metal (loid) immobilization and plant growth. *Plants*, 12(11), 2077. <https://doi.org/10.3390/plants12112077>
- 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* (1984), 28(2), 123-135.
- He, S., Niu, Y., Xing, L., Liang, Z., Song, X., Ding, M., & Huang, W. (2024). Research progress of the detection and analysis methods of heavy metals in plants. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1310328. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1310328>
- He, X. H., & Critchley, C. (2008). Frankia nodulation, mycorrhization and interactions between Frankia and mycorrhizal fungi in Casuarina plants. *Mycorrhiza*, 3, 767-781. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_36
- He, X. H., Chen, L. G., Hu, X. Q., & Asghar, S. (2004). Natural diversity of nodular microsymbionts of *Myrica rubra*. *Plant and soil*, 262, 229-239. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000037045.42440.1d>
- He, Y., Bond-Lamberty, B., Myers-Pigg, A. N., Newcomer, M. E., Ladau, J., Holmquist, J. R., Brown, J. B., & Falco, N. (2024). Effects of spatial variability in vegetation phenology, climate, landcover, biodiversity, topography, and soil property on soil respiration across a coastal ecosystem. *Heliyon*, 10(9). DOI: [10.1016/j.heliyon.2024.e30470](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30470)
- Hernández, A., Loera, N., Contreras, M., Fischer, L., & Sánchez, D. (2019). Comparison between *Lactuca sativa* L. and *Lolium perenne*: phytoextraction capacity of Ni, Fe, and Co from galvanoplastic industry. In *Energy Technology 2019: Carbon Dioxide Management and Other Technologies* (pp. 137-147). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06209-5_14
- Heydari, M., Hajinia, S., Jafarian, N., Karamian, M., Mosa, Z., Asgharzadeh, S., Rezaei, N., Guidi, L., Valkó, O., & Prévosto, B. (2023). Synergistic use of biochar and the plant growth-promoting rhizobacteria in mitigating drought stress on oak (*Quercus brantii* Lindl.) seedlings. *Forest Ecology and Management*, 531, 120793. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2023.120793>
- Hidouri, N., Missaoui, R., Jraba, A., Yousaf, B., Sleimi, N., & Hamed, Y. (2023). Assessing the vertical distribution and health risks of trace metal elements in phosphogypsum-enriched agricultural soils of typical peri-urban areas in Southwestern Tunisia. *Water, Air, & Soil Pollution*, 234(6), 332. <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06335-3>
- Hino, S., & Wilson, P. W. (1958). Nitrogen fixation by a facultative bacillus. *Journal of Bacteriology*, 75(4), 403-408. <https://doi.org/10.1128/jb.75.4.403-408.1958>
- Hong, Y.-S., Lee, B.-K., Park, J.-D., Sakong, J., Choi, J.-W., Moon, J.-D., Kim, D.-S., & Kim, B.-G. (2014). Blood Cadmium Concentration of Residents Living near Abandoned Metal Mines in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 29(5), 633-639. <https://doi.org/10.3346/jkms.2014.29.5.633>
- Hopkins, D. W., Alef, K., & Nannipieri, P. (1996). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. *Journal of Applied Ecology*, 33(1), 178.
- Horbach, S., Rauschkolb, R., & Römermann, C. (2023). Flowering and leaf phenology are more variable and stronger associated to functional traits in herbaceous compared to tree species. *Flora*, 300, 152218.
- Hosseini, M., Kamranjam, M., Brewer, R., Rezazadeh, M., & Ghorbanli, M. (2018). Environmental risks posed by heavy metal contamination from mine waste : Case study from northwest Iran. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 24, 1-18. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1416579>
- 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. *Science of the Total Environment*, 178(1-3), 21-28.
- Hrkić, I. Z., Pajević, S., Borišev, M., & Luković, J. (2020). Assessment of phytostabilization potential of two *Salix* L. clones based on the effects of heavy metals on the root anatomical traits. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(23), 29361-29383. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09228-8>
- Hseu, Z. Y. (2004). Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. *Bioresource technology*, 95(1), 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.008>
- Hsu, D., Flynn, J. R., Schuler, C. J., Santelli, C. M., Toner, B. M., Bond, D. R., & Gralnick, J. A. (2024). Isolation and genomic analysis of “*Metallumcola ferriviriculae*” MK1, a Gram-positive, Fe(III)-reducing

Références bibliographiques

- bacterium from the Soudan Underground Mine, an iron-rich Martian analog site. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(8), e00044-24. <https://doi.org/10.1128/aem.00044-24>
- Hu, H., Li, X., Gao, X., Wang, L., Li, B., Zhan, F., He, Y., Qin, L., & Liang, X. (2024). A review on the multifaceted effects of δ -MnO₂ on heavy metals, organic matter, and other soil components. *RSC Advances*, 14(51), 37752-37762. <https://doi.org/10.1039/D4RA06005A>
- Huang, L. (2008). Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* in Broth and Beef Frankfurters—Determination of Lag Phase Duration and Exponential Growth Rate under Isothermal Conditions. *Journal of Food Science*, 73(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00785.x>
- Huang, P.-T., Patel, M., Santagata, M. C., & Bobet, A. (2009). Classification of organic soils. <https://docs.lib.purdue.edu/jtrp/1186/>
- Hussain, B., Abbas, A., Saleem, A. R., Riaz, L., Rahman, S. U., Liu, S., Pu, S., & Farooq, M. (2024). Uptake, Agglomeration, and Detoxification of Trace Metals and Metalloids in Plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 24(3), 4965-4983. <https://doi.org/10.1007/s42729-024-01885-9>
- Huyssteen, V. I., Mulidzi, A. R., Meyer, A. H., & Wooldridge, J. (2020). Alteration index three facilitates interpretation of β -Glucosidase, acid-phosphatase and urease activities in soils irrigated with diluted winery wastewater. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 41(2), 238-244. <https://doi.org/10.21548/41-2-4195>
- Idowu, O. S., De Azevedo, L. B., Zohoori, F. V., Kanmodi, K., & Pak, T. (2023). Health risks associated with the production and usage of charcoal: a systematic review. *BMJ open*, 13(7), e065914. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2022-065914>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Iimaa, T., Batmunkh, M., Dulguun, B., Dorjsuren, B., Turmunkh, T., Tserennadmid, E., Surenjav, U., Choidash, B., & Gereltuya, R. (2025). Bacterial Heavy Metal Resistance in Contaminated Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, e2411073.
- INERIS. (2014). Les éléments traces métalliques dans les sols : sources, comportements et impacts environnementaux et sanitaires. Rapport de l'INERIS, France
- Irshad, K., Rehman, K., Fiayyaz, F., Sharif, H., Murtaza, G., Kamal, S., & Akash, M. S. H. (2021). Role of heavy metals in metabolic disorders. *Endocrine disrupting chemicals-induced metabolic disorders and treatment strategies*, 203-219. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45923-9_13
- Islam, Md. R., Akash, S., Jony, M. H., alam, Md. N., Nowrin, F. T., Rahman, Md. M., Rauf, A., & Thiruvengadam, M. (2023). Exploring the potential function of trace elements in human health : A therapeutic perspective. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 478(10), 2141-2171. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04638-3>
- ISTA (1999) International Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology*, 27, 25-30. - References—Scientific Research Publishing. (s. d.). Consulté le 17 septembre 2025, à l'adresse <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=3544320>
- IUSS Working Group WRB (2022). World Reference Base for Soil Resources. International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps. 4th edition. International Union of Soil Sciences (IUSS), Vienna, Austria.
- IUSS Working Group. (2014). World reference base for soil resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome.
- Ivanova, N. (2024). Global overview of the application of the Braun-Blanquet approach in research. *Forests*, 15(6), 937.
- Jach, M. E., Sajnaga, E., & Ziaja, M. (2022). Utilization of legume-nodule bacterial symbiosis in phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. *Biology*, 11(5), 676. <https://doi.org/10.3390/biology11050676>
- Jadhav, S.S., Gaikwad, A.S. and Karape, P.J. (2023) Plant nutrition and fertilizer management in horticultural crops. In: N. Ubale et al. (Eds.), *Modern Horizons in Horticulture Emerging Trends and Technologies*. Chapter 4, pp. 41-84. Elite Publishing House, New Delhi, India. ISBN: 978-93-58990-34-8. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.8378468>
- Jain, N., & Maiti, A. (2022). Fe-Mn-Al metal oxides/oxyhydroxides as As (III) oxidant under visible light and adsorption of total arsenic in the groundwater environment. *Separation and Purification Technology*, 302, 122170. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122170>

Références bibliographiques

- Jallouli, C., & Mickus, K. (2000). Regional gravity analysis of the crustal structure of Tunisia. *Journal of African Earth Sciences*, 30(1), 63-78. [https://doi.org/10.1016/S0899-5362\(00\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0899-5362(00)00008-7)
- Jallouli, C., Inoubli, M. H., & Albouy, Y. Y. (1996). Le corps igné de Nefza (Tunisie septentrionale): caractéristiques géophysiques et discussion du mécanisme de sa mise en place. *Notes du service Géologique de Tunisie*, 62, 109-123.
- Jatav, H. S., Rajput, V. D., Minkina, T., Singh, S. K., Chejara, S., Gorovtsov, A., ... & Kalinitchenko, V. P. (2021). Sustainable approach and safe use of biochar and its possible consequences. *Sustainability*, 13(18), 10362. <https://doi.org/10.3390/su131810362>
- Javed, S. A., Shahzad, S. M., Ashraf, M., Kausar, R., Arif, M. S., Albasher, G., Rizwana, H., & Shakoor, A. (2022). Interactive effect of different salinity sources and their formulations on plant growth, ionic homeostasis and seed quality of maize. *Chemosphere*, 291, 132678. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132678>
- Jha, C. K., Sharma, P., Shukla, A., Parmar, P., Patel, R., Goswami, D., & Saraf, M. (2021). Microbial enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase: An elixir for plant under stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115, 101664. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101664>
- Jia, Y., Li, J., Zeng, X., Zhang, N., Wen, J., Liu, J., ... & Su, S. (2022). The performance and mechanism of cadmium availability mitigation by biochars differ among soils with different pH: Hints for the reasonable choice of passivators. *Journal of Environmental Management*, 312, 114903. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114903>
- Jiang, H.-H., Cai, L.-M., Wen, H.-H., & Luo, J. (2020). Characterizing pollution and source identification of heavy metals in soils using geochemical baseline and PMF approach. *Scientific Reports*, 10(1), 6460. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63604-5>
- Jin, C., Li, Z., Hursthouse, A. S., Ding, X., Zhou, M., Chen, J., & Li, B. (2023). Manganese oxides mediated dissolve organic matter compositional changes in lake sediment and cadmium binding characteristics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 256, 114916. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114916>
- Jogawat, A., Yadav, B., Chhaya, & Narayan, O. P. (2021). Metal transporters in organelles and their roles in heavy metal transportation and sequestration mechanisms in plants. *Physiologia Plantarum*, ppl.13370. <https://doi.org/10.1111/ppl.13370>
- Joshi, S., Gangola, S., Bhandari, G., Bhandari, N. S., Nainwal, D., Rani, A., Malik, S., & Slama, P. (2023). Rhizospheric bacteria: The key to sustainable heavy metal detoxification strategies. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1229828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1229828>
- Kabata-Pendias, A. (2004). Soil-plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma*, 122(2-4), 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.004>
- Kamat, S. B., & Sankaranarayanan, V. N. (1975). Distribution of iron in estuarine and nearshore waters of Goa. *Indian J Mar Sci*.
- Kamunda, C., Mathuthu, M., & Madhuku, M. (2016). Health Risk Assessment of Heavy Metals in Soils from Witwatersrand Gold Mining Basin, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(7), 663. <https://doi.org/10.3390/ijerph13070663>
- Kandeler, E., & Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and fertility of Soils*, 6(1), 68-72. <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
- Kanekar, P. P., & Kanekar, S. P. (2022). Metallophilic, Metal-Resistant, and Metal-Tolerant Microorganisms. In P. P. Kanekar & S. P. Kanekar, *Diversity and Biotechnology of Extremophilic Microorganisms from India* (p. 187-213). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-1573-4_6
- Kang, K., & Peña, J. (2023). Siderophore-Mediated Mobilization of Manganese Limits Iron Solubility in Mixed Mineral Systems. *ACS Earth and Space Chemistry*, 7(4), 662-675. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.2c00271>
- Karaoglu, M., & Erdel, E. (2023). Soil Properties and Mapping of the ARALIK-IĞDIR Wind Erosion Area-I (surface). *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 18(2), 277-288. DOI:10.26471/cjees/2023/018/258
- Khadim, M. D., Wesal, A. B., & Peezhand, A. W. (2024). Overview of the impact of compost on bulk density, aggregate consistency and cation exchange capacity of soils and its consequential effect on crop productivity. *Cognizance Journal*. DOI: 10.47760/cognizance.2024.v04i06.021
- Khafouri, A., Talbi, E. H., Abdelouas, A., Benjmel, K., Antunes, I. M. H. R., & Abioui, M. (2022). Groundwater vulnerability and potentially toxic elements associated with the iron mining district of Ouixane (Northeast of Morocco). *Water*, 15(1), 118. <https://doi.org/10.3390/w15010118>

Références bibliographiques

- Khan, N., Bano, A., Ali, S., & Babar, M. A. (2020). Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 90, 189-203. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00571-x>
- Khanal, M., Guo, H., & Adhikary, D. (2019). 3D Numerical Study of Underground Coal Mining Induced Strata Deformation and Subsequent Permeability Change. *Geotechnical and Geological Engineering*, 37(1), 235-249. <https://doi.org/10.1007/s10706-018-0605-9>
- Khatoon, H., Solanki, P., Narayan, M., Tewari, L., Rai, J. P. N., & Hina Khatoon, C. (2017). Role of microbes in organic carbon decomposition and maintenance of soil ecosystem. *International Journal of Chemical Studies*, 5(6), 1648-1656.
- Khelifi, F., Batool, S., Kechiched, R., Padoan, E., Ncibi, K., & Hamed, Y. (2024). Abundance, distribution, and ecological/environmental risks of critical rare earth elements (REE) in phosphate ore, soil, tailings, and sediments : Application of spectroscopic fingerprinting. *Journal of Soils and Sediments*, 24(5), 2099-2118. <https://doi.org/10.1007/s11368-024-03771-4>
- Khelifi, F., Melki, A., Hamed, Y., Adamo, P., & Caporale, A. G. (2020). Environmental and human health risk assessment of potentially toxic elements in soil, sediments, and ore-processing wastes from a mining area of southwestern Tunisia. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(12), 4125-4139. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00434-z>
- Khelifi, F., Mokadem, N., Liu, G., Yousaf, B. A. L. A. L., Zhou, H., Ncibi, K., & Hamed, Y. (2021). Occurrence, contamination evaluation and health risks of trace metals within soil, sediments and tailings in southern Tunisia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03531-8>
- Khoso, M. A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, S., ... & Liu, F. (2024). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress*, 11, 100341. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100341>
- Khudhur, S. A., & Albarzinji, L. M. (2022). Some Enzymatic and Non-enzymatic Antioxidants Response under Nickel and Lead Stress for Some Fabaceae Trees. *ARO-THE SCIENTIFIC JOURNAL OF KOYA UNIVERSITY*, 10(2), 124-130. <http://dx.doi.org/10.14500/aro.11033>
- Kim, E. J., Yoo, J.-C., & Baek, K. (2014). Arsenic speciation and bioaccessibility in arsenic-contaminated soils : Sequential extraction and mineralogical investigation. *Environmental Pollution*, 186, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.032>
- Kim, E. J., Yoo, J.-C., & Baek, K. (2014). Arsenic speciation and bioaccessibility in arsenic-contaminated soils : Sequential extraction and mineralogical investigation. *Environmental Pollution*, 186, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.032>
- Kim, J. J., Lee, S. S., Fenter, P., Myneni, S. C., Nikitin, V., & Peters, C. A. (2023). Carbonate coprecipitation for Cd and Zn treatment and evaluation of heavy metal stability under acidic conditions. *Environmental Science & Technology*, 57(8), 3104-3113. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c07678>
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), 885-886. <https://doi.org/10.1038/286885a0>
- Kocsis, T., Kotrocó, Z., Kardos, L., & Biró, B. (2020). Optimization of increasing biochar doses with soil–plant–microbial functioning and nutrient uptake of maize. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101191. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101191>
- Kolling, C. E., Rampim, L., Müller, M. M. L., Pott, C. A., Prazeres, M. S., & Conrado, A. M. C. (2025). Soil chemical attributes and soybean performance as a function of acidity management and cover crops. *Revista Ciência Agronômica*, 56, e202391626. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20250042>
- Kolthoff, I. M. (2002). Theory of coprecipitation. The formation and properties of crystalline precipitates. *The Journal of Physical Chemistry*, 36(3), 860-881.
- Kothe, E., Dimkpa, C., Haferburg, G., Schmidt, A., Schmidt, A., & Schütze, E. (2010). Streptomycete heavy metal resistance: extracellular and intracellular mechanisms. *Soil heavy metals*, 225-235. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02436-8_10
- Kouchou, A., Rais, N., Thoisy, J. C., Duplay, J., Ghazi, M., Elsass, F., ... & El Ghachtouli, N. (2017). Behavior of enzyme activities exposed to contamination by heavy metals and dissolved organic carbon in calcareous agricultural soils. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 26(3), 259-276. <https://doi.org/10.1080/15320383.2017.1289499>

Références bibliographiques

- Koul, B., & Taak, P. (2018). Ex situ soil remediation strategies. In *Biotechnological strategies for effective remediation of polluted soils* (pp. 39-57). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2420-8_2
- Kraiem, Z., Maalaoui, F., Bouhlef, S., Sadik, C., & Sdiri, A. (2024). Predicting iron contents in the Tamra-Douahria mining site using a deep neural network approach. *Journal of Taibah University for Science*, 18(1), 2422646. <https://doi.org/10.1080/16583655.2024.2422646>
- Kumar, A., Joseph, S., Graber, E. R., Taherymoosavi, S., Mitchell, D. R. G., Munroe, P., Tsechansky, L., Lerdahl, O., Aker, W., & Sæbø, M. (2021). Fertilizing behavior of extract of organomineral-activated biochar : Low-dose foliar application for promoting lettuce growth. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00222-x>
- Kumar, S. B., Kalwasińska, A., Brzezinska, M. S., & Wróbel, M. (2024). Using halotolerant *Azotobacter chroococcum* W4ii from technosoils to mitigate wheat salt stress. *Open Research Europe*, 3, 76. <https://doi.org/10.12688/openreseurope.15821.4>
- Kumar, S., Chaudhuri, S., & Maiti, S. K. (2011). Soil phosphatase activity in natural and mined soil—A Review. *Indian Journal of Environmental Protection*, 31(11), 1-10.
- Kumar, S., Chaudhuri, S., & Maiti, S. K. (2013). Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil-a review. *Middle East J Sci Res*, 13(7), 898-906. DOI: 10.5829/idosi.mejsr.2013.13.7.2801
- Kumari, N., & Mohan, C. (2021). Basics of clay minerals and their characteristic properties. *Clay Clay Miner*, 24(1), 1-29. DOI: 10.5772/intechopen.97672
- Kunkel, B. N., & Harper, C. P. (2018). The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 245-254. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx447>
- Küpper, H., Gokul, A., Alavez, D., Dhungana, S. R., Bokhari, S. N. H., Keyster, M., & Mendoza-Cozatl, D. G. (2024). Identification and characterization of transition metal-binding proteins and metabolites in the phloem sap of *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry*, 300(10), 107741. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107741>
- Kushwaha, M., Mishra, A., Shankar, S., Goel, D., Joshi, S., & Ram, S. (2024). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agriculture: Recent progress and challenges. *Role of Green Chemistry in Ecosystem Restoration to Achieve Environmental Sustainability*, 333-342. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15291-7.00016-X>
- Laamari, I., Schnug, E., Bejaoui, Z., Slaimi, R., & Abassi, M. (2024). Differential responses of six *Casuarina* species to NaCl seed priming and salt stress during germination and early seedling growth. In *Arid Land Research and Management* (Vol. 38). <https://doi.org/10.1080/15324982.2024.2332893>
- Lake, L. M., Basta, N. T., & Barker, D. J. (2021). Modifying Effect of Soil Properties on Bio-Accessibility of As and Pb from Human Ingestion of Contaminated Soil. *Geosciences*, 11(3), 126. <https://doi.org/10.3390/geosciences11030126>
- Laloui, L., Klubertanz, G., & Vulliet, L. (2003). Solid-liquid-air coupling in multiphase porous media. *International Journal for Numerical and Analytical Methods in Geomechanics*, 27(3), 183-206. <https://doi.org/10.1002/nag.269>
- Leal, M. F. C., Catarino, R. I., Pimenta, A. M., & Souto, M. R. S. (2023). The influence of the biometals Cu, Fe, and Zn and the toxic metals Cd and Pb on human health and disease. *Trace Elements and Electrolytes*, 40(1), 1. DOI:10.5414/TE500038
- Lebrun, M., Miard, F., Bucci, A., Fougère, L., Nandillon, R., Naclerio, G., ... & Bourgerie, S. (2021). The rhizosphere of *Salix viminalis* plants after a phytostabilization process assisted by biochar, compost, and iron grit: chemical and (micro)-biological analyses. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(34), 47447-47462. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14113-z>
- Lebrun, M., Miard, F., Van Poucke, R., Tack, F. M., Scippa, G. S., Bourgerie, S., & Morabito, D. (2021). Effect of fertilization, carbon-based material, and redmud amendments on the bacterial activity and diversity of a metal (loid) contaminated mining soil. *Land Degradation & Development*, 32(8), 2618-2628. <https://doi.org/10.1002/ldr.3929>
- Lee, G., Jang, S. E., Jeong, W. G., Tsang, Y. F., & Baek, K. (2024). Stabilization mechanism and long-term stability of endogenous heavy metals in manure-derived biochar. *Science of the Total Environment*, 948, 174801. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174801>
- Lee, S. H., Kim, M. S., Kim, J. G., & Kim, S. O. (2020). Use of soil enzymes as indicators for contaminated soil monitoring and sustainable management. *Sustainability*, 12(19), 8209. <https://doi.org/10.3390/su12198209>

Références bibliographiques

- Lenhard, G., Nourse, L. D., & Schwartz, H. M. (1964). The measurement of dehydrogenase activity of activated sludges. *Advances in Water Pollution*, 2, 105-107.
- Li J, L. J., Xie Zheng Miao, X. Z., Zhu Yong Guan, Z. Y., & Ravi Naidu, R. N. (2005). Risk assessment of heavy metal contaminated soil in the vicinity of a lead/zinc mine. *Journal of Environmental Sciences*, 17(6), 881-885. DOI: 1001-0742(2005)06-
- Li, B. B., Li, P. P., Zhang, W. T., Ji, J. Y., Liu, G. B., & Xu, M. X. (2021b). Deep soil moisture limits the sustainable vegetation restoration in arid and semi-arid Loess Plateau. *Geoderma*, 399, 115122. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115122>
- Li, B., Lin, K., Liu, X., Ma, X., Li, X., Wu, Z., Li, C., Wu, T., & Yang, Z. (2025a). Mechanism of cadmium (Cd) enrichment in the soil of karst areas with high geochemical background in Southwest China. *Chemical Geology*, 673, 122523. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2024.122523>
- Li, B., Wei, D., Zhou, Y., Huang, Y., Tie, B., & Lei, M. (2021a). Mechanisms of arsenate and cadmium co-immobilized on ferrihydrite inferred from ternary surface configuration. *Chemical Engineering Journal*, 424, 130410. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130410>
- Li, B., Zhang, H., Long, J., Fan, J., Wu, P., Chen, M., Liu, P., & Li, T. (2022). Migration mechanism of pollutants in karst groundwater system of tailings impoundment and management control effect analysis : Gold mine tailing impoundment case. *Journal of Cleaner Production*, 350, 131434. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131434>
- Li, G., Zhang, F., Ma, Y., Zhang, X., Liu, Q., Ye, R., ... & Liu, X. (2025b). Enhanced Stabilization of Lead in Soil Using Novel Biochar Composites Under Simulated Accelerated Aging Conditions. *Sustainability*, 17(6), 2563. <https://doi.org/10.3390/su17062563>
- Li, H., Santos, F., Butler, K., & Herndon, E. (2021). A Critical Review on the Multiple Roles of Manganese in Stabilizing and Destabilizing Soil Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, 55(18), 12136-12152. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00299>
- Li, H., Wang, B., Siri, M., Liu, C., Feng, C., Shao, X., & Liu, K. (2023). Calcium-modified biochar rather than original biochar decreases salinization indexes of saline-alkaline soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(30), 74966-74976. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27701-y>
- Li, H., Yao, J., Min, N., Liu, J., Chen, Z., Zhu, X., ... & Duran, R. (2022). Relationships between microbial activity, enzyme activities and metal (loid) form in NiCu tailings area. *Science of The Total Environment*, 812, 152326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152326>
- Li, H., Yao, J., Min, N., Sunahara, G., & Duran, R. (2023b). New insights on the effect of non-ferrous metal mining and smelting activities on microbial activity characteristics and bacterial community structure. *Journal of Hazardous Materials*, 453, 131301. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131301>
- Li, J. T., Gurajala, H. K., Wu, L. H., Van Der Ent, A., Qiu, R. L., Baker, A. J., ... & Shu, W. S. (2018). Hyperaccumulator plants from China: a synthesis of the current state of knowledge. *Environmental science & technology*, 52(21), 11980-11994. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01060>
- Li, M. S., Luo, Y. P., & Su, Z. Y. (2007). Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environmental pollution*, 147(1), 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.006>
- Linnik, P., Osadchyi, V., Osadcha, N., & Linnik, R. (2023). Redox potential as an important characteristic of the chemical and biological state of surface waters (review). *Chemistry and Ecology*, 39(6), 640-672. <https://doi.org/10.1080/02757540.2023.2225496>
- Liu, F., Wang, G., Liang, X., Qu, S., Shi, Z., Li, J., & Luo, A. (2023). Temporal variation of groundwater hydrochemistry and water stable isotopes under long-term mining disturbance in a coal mine, northwest China. *Applied Geochemistry*, 158, 105802. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2023.105802>
- Liu, H., Xie, J., Cheng, Z., & Wu, X. (2023a). Characteristics, chemical speciation and health risk assessment of heavy metals in paddy soil and rice around an abandoned high-arsenic coal mine area, Southwest China. *Minerals*, 13(5), 629. <https://doi.org/10.3390/min13050629>
- Liu, J., Li, Y., Wang, Y., Wang, Y., Xu, J., & Liu, X. (2023b). Competitive adsorption of lead and cadmium on soil aggregate at micro-interfaces : Multi-surface modeling and spectroscopic studies. *Journal of Hazardous Materials*, 448, 130915. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130915>
- Liu, N., Zhao, G., Ye, W., & Liu, G. (2023c). Effects of UV-irradiation on Cd²⁺ and Pb²⁺ binding to humic/fulvic acids : Methodological guidance to eliminating the interference of dissolved organic matter on SWASV

Références bibliographiques

- detection of heavy metals in soil extracts. *Environmental Technology & Innovation*, 31, 103232. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103232>
- Liu, N., Zhao, J., Du, J., Hou, C., Zhou, X., Chen, J., & Zhang, Y. (2024). Non-phytoremediation and phytoremediation technologies of integrated remediation for water and soil heavy metal pollution : A comprehensive review. *Science of the Total Environment*, 948, 174237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174237>
- Liu, S., Xu, X., He, C., Liu, Z., & Li, Y. (2024). Biosorption of Pb²⁺, Cd²⁺ and Zn²⁺ from aqueous solutions by *Agrobacterium tumefaciens* S12 isolated from acid mine drainage. *Sustainable Environment Research*, 34(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s42834-024-00233-x>
- Liu, Z., Li, J., Chen, Y., Zhang, F., & Feng, W. (2025). Long-Term Trends and Ecological Risks of Heavy Metal Accumulation in Cultivated Land of Songnen Plain, China. *Toxics*, 13(1), 59. <https://doi.org/10.3390/toxics13010059>
- Lobo, E. A., Heinrich, C. G., Schuch, M., Wetzel, C. E., & Ector, L. (2016). Diatoms as bioindicators in rivers. *River algae*, 245-271. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31984-1_11
- Loeppert, R. H., & Clarke, E. T. (1984). Reactions of Fe²⁺ and Fe³⁺ in calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5), 149-163. <https://doi.org/10.1080/01904168409363182>
- Lou, Y., Joseph, S., Li, L., Graber, E. R., Liu, X., & Pan, G. (2016). Water extract from straw biochar used for plant growth promotion : An initial test. *BioResources*, 11(1), 249-266.
- Loza, I. M., Pakhomov, O. Y., & Chorna, V. I. (2018). Evaluation of remediation efficiency of manganese quarry lands after open-cut mining : Ecosystem approach. *Naukovyi Visnyk Natsionalnoho Hirnychoho Universytetu*, 4, 122-128. <https://doi.org/10.29202/nvngu/2018-4/16>
- Lu, Z., Zhang, H., Shahab, A., Zhang, K., Zeng, H., Bacha, A.-U.-R., Nabi, I., & Ullah, H. (2021). Comparative study on characterization and adsorption properties of phosphoric acid activated biochar and nitrogen-containing modified biochar employing Eucalyptus as a precursor. *Journal of Cleaner Production*, 303, 127046. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127046>
- Luc, B. T., Karim, K., Moumouni, D., Alain, T. K., Cisse, O. I., & Zougmore, F. (2022). Assessment of Heavy Metal Concentration in Soil and Plant and Evaluation of Bioconcentration Factor at Loumbila Market Gardening Perimeters, Burkina Faso. *Asian Journal of Physical and Chemical Sciences*, 25-34. <https://doi.org/10.9734/ajopacs/2022/v10i230153>
- Luo, L., Capezzuoli, E., Rogerson, M., Vaselli, O., Wen, H., & Lu, Z. (2022). Precipitation of carbonate minerals in travertine-depositing hot springs: Driving forces, microenvironments, and mechanisms. *Sedimentary Geology*, 438, 106207. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2022.106207>
- Luo, X.S.; Ding, J.; Xu, B. Incorporating bioaccessibility into human health risk assessments of heavy metals in urban park soils. *Sci. Total Environ.* 2012, 424, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.053>
- Lv, Y., Wang, X., Xue, W., Liu, Y., & Wu, B. (2024). Addition of microbes shifts the ability of soil carbon sequestration in the process of soil Cd remediation. *Journal of Soils and Sediments*, 24(7), 2669-2683. <https://doi.org/10.1007/s11368-024-03834-6>
- Lwin, C. S., Seo, B. H., Kim, H. U., Owens, G., & Kim, K. R. (2018). Application of soil amendments to contaminated soils for heavy metal immobilization and improved soil quality—A critical review. *Soil science and plant nutrition*, 64(2), 156-167. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1440938>
- Ma Xing Zhu, M. X. (2010). Activity of soil fluorescein diacetate (FDA) hydrolase under long-term fertilization.
- Ma, J., Quan, G., Yan, J., Ippolito, J. A., Cui, L., Wang, H., Qiu, T., & Sun, Y. (2022). Biochar extract compounds alter germination and growth of crop seed. *BioResources*, 17(3), 4151. DOI:10.15376/biores.17.3.4151-4166
- Ma, W., Tang, S., Dengzeng, Z., Zhang, D., Zhang, T., & Ma, X. (2022). Root exudates contribute to belowground ecosystem hotspots: A review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 937940. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.937940>
- Ma, Y., Zhang, F., Cheng, L., Zhang, D., Wu, X., Ma, Y., ... & Xing, B. (2025). Remediation potential of biochar for As and Cd by modifying soil physicochemical properties: a conceptual model elucidating stabilization mechanism based on conditional probability theory. *Biochar*, 7(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s42773-025-00455-1>
- Machuca, A., Cuba-Díaz, M., & Córdova, C. (2015). Enzymes in the rhizosphere of plants growing in the vicinity of the Polish Arctowski Antarctic Station. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(4), 833-838. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000057>

Références bibliographiques

- Mafakheri, N., Shamsipur, M., & Babajani, N. (2024). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction procedure based on a natural deep eutectic solvent for ligand-less preconcentration and determination of heavy metals from water and food samples. *Microchemical Journal*, 199, 110010. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110010>
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19621604893>
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, 9(1), 97. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Maiti, S. K., Bandyopadhyay, S., & Mukhopadhyay, S. (2021). Importance of selection of plant species for successful ecological restoration program in coal mine degraded land. In *Phytorestoration of abandoned mining and oil drilling sites* (pp. 325-357). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821200-4.00014-5>
- Maity, P. J., & Pawlowski, K. (2021). Anthropogenic influences on the distribution of the *Casuarina-Frankia* symbiosis. *Symbiosis*, 84(3), 353-367. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00765-5>
- Majone, M., Papini, M. P., & Rolle, E. (1996). Modeling lead adsorption on clays by models with and without electrostatic terms. *Journal of colloid and interface science*, 179(2), 412-425. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.0232>
- Mambu, S. M. (2014). Soil Dehydrogenase Activity: A Comparison Between the TTC and INT Method. A review. *Jurnal Ilmiah Sains*, 87-94. <https://doi.org/10.35799/jis.14.2.2014.5937>
- Manceau, A., Marcus, M. A., & Tamura, N. (2002). Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 49(1), 341-428. <https://doi.org/10.2138/gsrmg.49.1.341>
- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of environmental management*, 254, 109779. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109779>
- Mao, L., Kang, K., Kong, H., Zhu, E., Zhang, Z., Li, Y., & Tao, H. (2025). Quantifying the contributions of factors to bioaccessible Cd and Pb in soil using machine learning. *Journal of Hazardous Materials*, 487, 137102. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.137102>
- Maphuhla, N. G., Lewu, F. B., & Oyediji, O. O. (2022). Enzyme activities in reduction of heavy metal pollution from Alice landfill site in eastern cape, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(19), 12054. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912054>
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 795-799. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998>
- Marciulioniene, D., Montvydiene, D., Karlaviciene, V., & Hogland, W. (2005). *Lepidium sativum* L. as test-organism for assessment of environmental pollution. *Linnaeus Eco-Tech*, 553-561. <https://doi.org/10.15626/Eco-Tech.2005.055>
- Margalef, O., Sardans, J., Maspons, J., Molowny-Horas, R., Fernández-Martínez, M., Janssens, I. A., ... & Peñuelas, J. (2021). The effect of global change on soil phosphatase activity. *Global Change Biology*, 27(22), 5989-6003. <https://doi.org/10.1111/gcb.15832>
- Martin, A. P., Turnbull, R. E., Rissmann, C. W., & Rieger, P. (2017). Heavy metal and metalloid concentrations in soils under pasture of southern New Zealand. *Geoderma Regional*, 11, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2017.08.005>
- Martínez, C. E., & McBride, M. B. (1998). Solubility of Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ in aged coprecipitates with amorphous iron hydroxides. *Environmental science & technology*, 32(6), 743-748
- Martinez, C. E., & Tabatabai, M. A. (1997). Decomposition of biotechnology by-products in soils. (*American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America*, 26 (3), 625-632).. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030006x>
- Martínez-Toledo, Á., González-Mille, D. J., Briones-Gallardo, R., Carrizalez-Yañez, L., Martínez-Montoya, J. F., de Jesús Mejía-Saavedra, J., & Ilizaliturri-Hernández, C. A. (2023). Functioning of semi-arid soils under long-term mining activity with trace elements at high concentrations. *Catena*, 222, 106851. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2022.106851>

Références bibliographiques

- Martínez-Toledo, Á., Montes-Rocha, A., González-Mille, D. J., Espinosa-Reyes, G., Torres-Dosal, A., Mejía-Saavedra, J. J., & Ilizaliturri-Hernández, C. A. (2017). Evaluation of enzyme activities in long-term polluted soils with mine tailing deposits of San Luis Potosí, México. *Journal of Soils and Sediments*, 17(2), 364-375. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1529-8>
- Mattigod, S. V., Sposito, G., & Page, A. L. (1981). Factors affecting the solubilities of trace metals in soils. *Chemistry in the soil environment*, 40, 203-221. <https://doi.org/10.2134/asaspecpub40.c11>
- Maumela, P., & Serepa-Dlamini, M. H. (2024). Compost Biostimulation for Improved Soil Bioremediation using Endophytic *Bacillus* Sp. *Chemical Engineering Transactions*, 111, 733-738. <https://doi.org/10.3303/CET24111123>
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant physiology and Biochemistry*, 42(6), 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>
- MDDELCC. (2014). Protocole d'échantillonnage de l'eau de surface pour l'analyse des métaux en traces. Développement durable, environnement et lutte contre les changements climatiques Québec.
- Meers, E., Du Laing, G., Unamuno, V., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Tack, F. M., & Verloo, M. G. (2007). Comparison of cadmium extractability from soils by commonly used single extraction protocols. *Geoderma*, 141(3-4), 247-259. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.06.002>
- Meesungnoen, O., Chantiratikul, P., Thumanu, K., Nuengchamnong, N., Hokura, A., & Nakbanpote, W. (2021). Elucidation of crude siderophore extracts from supernatants of *Pseudomonas* sp. ZnCd2003 cultivated in nutrient broth supplemented with Zn, Cd, and Zn plus Cd. *Archives of Microbiology*, 203(6), 2863-2874. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02274-x>
- Mehmood, T., Liu, C., Niazi, N. K., Gaurav, G. K., Ashraf, A., & Bibi, I. (2021). Compost-mediated arsenic phytoremediation, health risk assessment and economic feasibility using *Zea mays* L. in contrasting textured soils. *International Journal of Phytoremediation*, 23(9), 899-910. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1865267>
- Mekala, S., Mantri, C. P., Purma, S., Pasupuleti, S. B., & Kumar, A. (2019). Evaluation and comparison of DTPA extractanting methods for available cationic micronutrients in non-acidic soils of Andhra Pradesh, India. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 9, 269-277. doi: 10.17265/2161-6256/2019.05.001
- Mendoza, C. J., Garrido, R. T., Quilodrán, R. C., Segovia, C. M., & Parada, A. J. (2017). Evaluation of the bioaccessible gastric and intestinal fractions of heavy metals in contaminated soils by means of a simple bioaccessibility extraction test. *Chemosphere*, 176, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.066>
- Mensah, A. K., & Amoakwah, E. (2024). Soil Biogeochemical Factors Influencing Mobilization of Toxic. Perspectives and Insights on Soil Contamination and Effective Remediation Techniques, 41. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1005487>
- Mensah, A. K., Marschner, B., Shaheen, S. M., & Rinklebe, J. (2022). Biochar, compost, iron oxide, manure, and inorganic fertilizer affect bioavailability of arsenic and improve soil quality of an abandoned arsenic-contaminated gold mine spoil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234, 113358. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113358>
- Merino, C., Godoy, R., & Matus, F. (2016). Soil enzymes and biological activity at different levels of organic matter stability. *Journal of soil science and plant nutrition*, 16(1), 14-30. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000002>
- Mezned, N., Alayet, F., Dkhala, B., & Abdeljaouad, S. (2022). Field hyperspectral data and OLI8 multispectral imagery for heavy metal content prediction and mapping around an abandoned Pb-Zn mining site in northern Tunisia. *Heliyon*, 8(6), e09712. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09712>
- Michálková, Z., Komárek, M., Veselská, V., & Číhalová, S. (2016). Selected Fe and Mn (nano) oxides as perspective amendments for the stabilization of As in contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11), 10841-10854. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6200-9>
- Minnikova, T. V., Kolesnikov, S. I., Evstegneeva, N. A., Timoshenko, A. N., Tsepina, N. I., & Kazeev, K. S. (2024). Assessment of Enzymatic Activity of Haplic Chernozem Soils Contaminated with Ag, Bi, Te, and Tl. *Počvovedenie*, (3), 412-427. DOI: 10.1134/S1064229323603037
- Miu, B. A., Pop, C. E., Crăciun, N., & Deák, G. (2022). Bringing life back into former mining sites: A mini-review on soil remediation using organic amendments. *Sustainability*, 14(19), 12469. <https://doi.org/10.3390/su141912469>

Références bibliographiques

- Mlayah, A., Ferreira Da Silva, E. A., Lachaal, F., Khadhar, S., Charef, A., & Noronha, F. (2013). Effet auto-épurateur de la lithologie des affleurements géologiques dans un climat semi-aride : Cas du bassin versant de l'Oued Mellègue (Nord-Ouest de la Tunisie). *Hydrological Sciences Journal*, 58(3), 686-705. <https://doi.org/10.1080/02626667.2013.772300>
- Mobley, H. L., Island, M. D., & Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological reviews*, 59(3), 451-480. <https://doi.org/10.1128/mr.59.3.451-480.1995>
- Mohan, S. V., Nithila, P., & Reddy, S. J. (1996). Estimation of heavy metals in drinking water and development of heavy metal pollution index. *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 31(2), 283-289. <https://doi.org/10.1080/10934529609376357>
- Molnár, Z., Solomon, W., Mutum, L., & Janda, T. (2023). Understanding the mechanisms of Fe deficiency in the rhizosphere to promote plant resilience. *Plants*, 12(10), 1945. <https://doi.org/10.3390/plants12101945>
- Monchanin, C., Devaud, J. M., Barron, A. B., & Lihoreau, M. (2021). Current permissible levels of metal pollutants harm terrestrial invertebrates. *Science of the Total Environment*, 779, 146398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146398>
- Mourinha, C., Palma, P., Alexandre, C., Cruz, N., Rodrigues, S. M., & Alvarenga, P. (2022). Potentially toxic elements' contamination of soils affected by mining activities in the Portuguese sector of the Iberian Pyrite Belt and optional remediation actions: A review. *Environments*, 9(1), 11. <https://doi.org/10.3390/environments9010011>
- Mousavi, S. M., Brodie, G., Payghamzadeh, K., Raiesi, T., & Strivastava, A. K. (2022). Lead bioavailability in the environment : Its exposure and and effects. *Journal of Advances in Environmental Health Research*, 10(1), 1-14. DOI: 10.32598/JAEHR.10.1.1256
- Moussi, B., Medhioub, M., Hatira, N., Yans, J., Hajjaji, W., Rocha, F., Labrincha, J. A., & Jamoussi, F. (2011). Identification and use of white clayey deposits from the area of Tamra (northern Tunisia) as ceramic raw materials. *Clay Minerals*, 46(1), 165-175. <https://doi.org/10.1180/claymin.2011.046.1.165>
- Muehe, E. M., Adaktylou, I. J., Obst, M., Zeitvogel, F., Behrens, S., Planer-Friedrich, B., Kraemer, U., & Kappler, A. (2013). Organic Carbon and Reducing Conditions Lead to Cadmium Immobilization by Secondary Fe Mineral Formation in a pH-Neutral Soil. *Environmental Science & Technology*, 47(23), 13430-13439. <https://doi.org/10.1021/es403438n>
- Mukherjee, A., Coomar, P., Sarkar, S., Johannesson, K., Fryar, A., Schreiber, M., Ahmed, K. M., Alam, M. A., Bhattacharya, P., Bundschuh, J., Burgess, W., Chakraborty, M., Coyte, R., Farooqi, A., Guo, H., Ijumulana, J., Jeelani, G., Mondal, D., Nordstrom, D., & Vengosh, A. (2024). Arsenic and other geogenic contaminants in global groundwater. *Nature Reviews Earth & Environment*, 5, 312-328. <https://doi.org/10.1038/s43017-024-00519-z>
- Mukhopadhyay, R., Sarkar, B., Barman, A., Datta, S. C., & Manjaiah, K. M. (2021). Arsenic adsorption on modified clay minerals in contaminated soil and water: Impact of pH and competitive anions. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 49(4), 2000259. <https://doi.org/10.1002/CLEN.202000259>
- Muller, G. (1969). Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. *Geojournal*, 118 (6), 1205-1220,
- Murillo-Delgado, J. O., Jimenez-Torres, H. D., Alvarez-Bobadilla, J. I., Gutierrez-Ortega, J. A., Camacho, J. B., Valle, P. F. Z., Barcelo-Quintal, I. D., Delgado, E. R., & Gomez-Salazar, S. (2021). Chemical speciation of selected toxic metals and multivariate statistical techniques used to assess water quality of tropical Mexican Lake Chapala. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(7), 418. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09185-w>
- Musa, D. G., David, L. D., & Allahnanan, E. (2025). Heavy Metal Contamination in Soil and Sustainability Risks in Artisanal Mining Areas : A Case Study of Mayo-Sinna, Sardauna Local Government Area, Taraba State, Nigeria. *Journal of Global Ecology and Environment*, 21(3), 133-138.
- Musa, D. G., David, L. D., Ahmed, Y. M., Allahnanan, E., Joshua, M. M., & Hauwa, A. (2025). Assessment of Heavy Metal Contamination in Soils of Gashaka Local Government Area, Nigeria Using Geo-Accumulation Index. *Journal of Geography, Environment and Earth Science International*, 29(8), 1-7. <https://doi.org/10.9734/jgeesi/2025/v29i8929>
- Nadgórska-Socha, A., Kandziora-Ciupa, M., Ciepał, R., Musialik, D., & Barczyk, G. (2013). The activity of selected soil enzymes, and soil contamination with zinc, cadmium and lead in the vicinity of the zinc smelter “Miasteczko Slaskie”. *Ecological Chemistry and Engineering. A*, 20(1).

Références bibliographiques

- Nadieline, C., Valentin, Krasova-Wade, T., Farma, M., & Diegane, D. (2023). Evaluation of the capacity of organic matter as an inoculum carrier for phosphorus-solubilizing bacteria in semi-arid tropical zones. 20305-20318. <https://doi.org/10.35759/JABs.192.2>
- Naidja, A., Huang, P. M., & Bollag, J. M. (2000). Enzyme-clay interactions and their impact on transformations of natural and anthropogenic organic compounds in soil. *Journal of Environmental Quality*, 29(3), 677-691. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900030002x>
- Nandillon, R., Lebrun, M., Miard, F., Gaillard, M., Sabatier, S., Morabito, D., & Bourgerie, S. (2021). Contrasted tolerance of *Agrostis capillaris* metalicolous and non-metallicolous ecotypes in the context of a mining technosol amended by biochar, compost and iron sulfate. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(4), 1457-1475. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00447-8>
- Nandillon, R., Miard, F., Lebrun, M., Gaillard, M., Sabatier, S., Bourgerie, S., Battaglia-Brunet, F., & Morabito, D. (2019). Effect of Biochar and Amendments on Pb and As Phytotoxicity and Phytoavailability in a Technosol. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 47(3), 1800220. <https://doi.org/10.1002/clen.201800220>
- Nautiyal CS. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Navas, M., Pérez-Esteban, J., Torres, M. A., Hontoria, C., & Moliner, A. (2021). Taxonomic and functional analysis of soil microbial communities in a mining site across a metal (loid) contamination gradient. *European Journal of Soil Science*, 72(3), 1190-1205. <https://doi.org/10.1111/ejss.12979>
- Negra, L. (1987) *Pétrologie, minéralogie et géochimie des minéralisations et des roches encaissantes des bassins associés aux structures tectoniques et magmatiques de l'Oued Bélif et du JebelHaddada (Nord des Nefza, Tunisie septentrionale)*. Unpublished Ph.D. Thesis, Paris-Sud University, Paris, 223 p.
- Neumeister, S., Algeo, T. J., Bechtel, A., Gawlick, H. J., Gratzner, R., & Sachsenhofer, R. F. (2016). Redox conditions and depositional environment of the Lower Jurassic Bächental bituminous marls (Tyrol, Austria). *Austrian journal of earth sciences*, 109(2). DOI: 10.17738/ajes.2016.0010
- Newsome, L., & Falagán, C. (2021). The microbiology of metal mine waste: bioremediation applications and implications for planetary health. *GeoHealth*, 5(10), e2020GH000380. <https://doi.org/10.1029/2020GH000380>
- NF EN 27888. (1994). Afnor EDITIONS. Qualité de l'eau _ détermination de la conductivité électrique. ,
- NF EN ISO 10523. (2012). Afnor EDITIONS. Qualité de l'eau _ détermination du pH.
- NF ISO 11265. (s. d.). Afnor EDITIONS. Consulté 8 août 2025, à l'adresse <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-iso-11265/qualite-du-sol-determination-de-la-conductivite-electrique-specifique/fa027995/14418>
- Ngalimat, M. S., Mohd Hata, E., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Mohd Zainudin, N. A. I., ... & Yusof, M. T. (2021). Plant growth-promoting bacteria as an emerging tool to manage bacterial rice pathogens. *Microorganisms*, 9(4), 682. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040682>
- Nguyen, T. B., Sherpa, K., Bui, X. T., Nguyen, V. T., Vo, T. D. H., Ho, H. T. T., ... & Dong, C. D. (2023). Biochar for soil remediation: A comprehensive review of current research on pollutant removal. *Environmental Pollution*, 337, 122571. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122571>
- Nikolić, M., & Tomašević, V. (2020). Implication of the plant species belonging to the brassicaceae family in the metabolization of heavy metal pollutants in urban settings. *Pol J Environ Stud*, 30(1), 523-534. <https://doi.org/10.15244/PJOES/122770>
- NIM (2024). Mean monthly values of temperature and rainfall in Bizerte, National Institute of Meteorology.
- Ningombam, L., Hazarika, B. N., Yumkhaibam, T., Heisnam, P., & Singh, Y. D. (2024). Heavy metal priming plant stress tolerance deciphering through physiological, biochemical, molecular and omics mechanism. *South African Journal of Botany*, 168, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.02.032>
- Niskanen, R., & Mäntylähti, V. (1987). Determination of soil specific surface area by water vapor adsorption : II Dependence of soil specific surface area on clay and organic carbon content. *Agricultural and Food Science*, 59(2), 67-72. <https://doi.org/10.23986/afsci.72249>
- Niu, S., Gao, L., & Wang, X. (2019). Characterization of contamination levels of heavy metals in agricultural soils using geochemical baseline concentrations. *Journal of Soils and Sediments*, 19(4), 1697-1707. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2190-1>

Références bibliographiques

- Nkoh, J. N., Baquy, M. A. A., Mia, S., Shi, R., Kamran, M. A., Mehmood, K., & Xu, R. (2021). A critical-systematic review of the interactions of biochar with soils and the observable outcomes. *Sustainability*, 13(24), 13726. <https://doi.org/10.3390/su132413726>
- Nnaji, N. D., Anyanwu, C. U., Miri, T., & Onyeaka, H. (2024a). Mechanisms of Heavy Metal Tolerance in Bacteria : A Review. *Sustainability*, 16(24), 11124. <https://doi.org/10.3390/su162411124>
- Norme NF EN ISO 5667-1. (2007). Qualité de l'eau _ échantillonnage : partie 1: lignes directrices pour la conception des programmes et des techniques d'échantillonnage
- Norme XP P94-041. (s. d.). Consulté 10 août 2025, à l'adresse <https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/xp-p94041/sols-reconnaissance-et-essais-identification-granulometrique-methode-de-tam/fa042149/11085>
- Nouairi, J., Baraud, F., Leleyter, L., Mefteh, S., Rocha, F., & Medhioub, M. (2021). Spatial distribution and ecological risk assessment of potentially toxic elements in agricultural soils, stream sediments, and plants around Lakhout mine (northwestern Tunisia). *Arabian Journal of Geosciences*, 14(2), 130. <https://doi.org/10.1007/s12517-020-06435-y>
- Noumi, Z., Dhaou, S. O., Derbel, S., & Chaieb, M. (2010). The status of Asteraceae in the arid and Saharan flora of North African region : Case of Tunisia. *Pak. J. Bot*, 42(3), 1417-1422.
- Nouri, M., El Rasafi, T., & Haddioui, A. (2017). Levels of metals in soils of ait ammar iron mine, Morocco : Human health risks. *Acta Chemica Iasi*, 25(2), 127-144. DOI: 10.1515/achi-2017-0012
- Nsibandé, T. S., & Nkosi, S. E. (2023). Phytosociological study and veld condition of Reedsdell farm in the North-Eastern Cape Grasslands Priority areas, South Africa. *Phytocoenologia*, 51(4). DOI:10.1127/phyto/2023/0408
- Obiri, S., Yeboah, P. O., Osa, S., & Adu-Kumi, S. (2016). Levels of arsenic, mercury, cadmium, copper, lead, zinc and manganese in serum and whole blood of resident adults from mining and non-mining communities in Ghana. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(16), 16589-16597. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6537-0>
- Oleńska, E., Małek, W., Swiecicka, I., Wójcik, M., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2025). Bacteria Under Metal Stress—Molecular Mechanisms of Metal Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5716. <https://doi.org/10.3390/ijms26125716>
- OMS. Qualité de l'eau potable. (2006). <https://www.lenntech.fr/applications/potable/normes/normes-oms-eau-potable.htm>
- ONM (2019). OFFICE NATIONAL DES MINES - PROGRAMME 2019
- ONM. (2008). Guidelines for drinking water quality. Incorporating 2nd addendum (3rd ed.). Geneva : World health organization.
- ONM. (2017). Guidelines for Drinking-water Quality, 4e édition.
- ONM-Office National des Mines. (2005). Annuaire statistique, mines et dérivés. Ministère de l'industrie (1997-2005), Tunis
- Orisakwe, E. U., Oguzie, E. E., Okeke, P. N., & Onyema, C. The Influence of Electrokinetic Remediation Process on the Removal of Cationic and Anionic Dyes from Kaolinitic Soils. DOI: 10.56201/ijccp.v8.no1.2022.pg79.98
- Ortiz-Castillo, J. E., Mirazimi, M., Mohammadi, M., Dy, E., & Liu, W. (2021). The role of microorganisms in the formation, dissolution, and transformation of secondary minerals in mine rock and drainage: A review. *Minerals*, 11(12), 1349. <https://doi.org/10.3390/min11121349>
- Osborne, J. M., & Schatral, A. (1997). Late autumn and early winter sowings increase survival of native plant species in rehabilitated mine sites in the Western Australian Kwongan. *International Journal of Surface Mining, Reclamation and Environment*, 11(2), 95-103. <https://doi.org/10.1080/09208119708944067>
- Ouerghi, S. (2019). A GIS-Based Geological Model for Assessing the Reserves of Phosphate in the Tozeur-Nefta Field, Southern Tunisia. *International Journal of Geosciences*, 10(05), 589. <https://doi.org/10.4236/ijg.2019.105034>
- Ouyang, N., Zhang, Y., Sheng, H., Zhou, Q., Huang, Y., & Yu, Z. (2021). Clay mineral composition of upland soils and its implication for pedogenesis and soil taxonomy in subtropical China. *Scientific Reports*, 11(1), 9707. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89049-y>
- Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy metals in crop plants: transport and redistribution processes on the whole plant level. *Agronomy*, 5(3), 447-463. <https://doi.org/10.3390/agronomy5030447>

Références bibliographiques

- Pajević, S., Borišev, M., Nikolić, N., Arsenov, D. D., Orlović, S., & Župunski, M. (2016). Phytoextraction of heavy metals by fast-growing trees: a review. *Phytoremediation: management of environmental contaminants*, volume 3, 29-64. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40148-5_2
- Pal, A., Bhattacharjee, S., Saha, J., Sarkar, M., & Mandal, P. (2022). Bacterial survival strategies and responses under heavy metal stress: a comprehensive overview. *Critical reviews in microbiology*, 48(3), 327-355. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1970512>
- Palumbo, B., Angelone, M., Bellanca, A., Dazzi, C., Hauser, S., Neri, R., & Wilson, J. (2000). Influence of inheritance and pedogenesis on heavy metal distribution in soils of Sicily, Italy. *Geoderma*, 95(3-4), 247-266. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(99\)00090-7](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(99)00090-7)
- Palupi, N. P., Hardi, E. H., Fahrunsyah, D. E. R., Nugroho, R. A., Darma, S., Idris, S. D., & Sripati, A. B. (2024). Rice Straw Compost and Husk Biochar as Growth Starters and In Vitro Heavy Metal Biosorbents. *Nongye Jixie Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery*, 55(4). <https://doi.org/10.62321/issn.1000-1298.2024.04.01>
- Panda, A., Fatnani, D., & Parida, A. K. (2025). Uptake, impact, adaptation mechanisms, and phytoremediation of heavy metals in plants: Role of transporters in heavy metal sequestration. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109578. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109578>
- Panda, S. S., Minz, A. P., & Dhal, N. K. (2014). Floristic studies of Lajkura coal mines area Jharsuguda, Odisha: an overview. *International Journal of Scientific and Research Publication*, 4(12), 1-11.
- Parida, T., Riyazuddin, S., Kolli, S. K., Chakraborty, A., Srinivas, N., Kundu, P., ... & Biswas, J. K. (2024). Phytoremediation of heavy metal (loid) s with integral involvement of the endogenous metal-chelators: present state-of-the-art and future prospect. *Discover Environment*, 2(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s44274-024-00170-x>
- Park, J. H. (2012). Application of phosphates for metal immobilization. pp 231- 241
- Park, M. J., Yoon, M. H., & Nam, I. H. (2014). Characterization of urease-producing bacteria isolated from heavy metal contaminated mine soil. *Journal of soil science and fertilizer*, 47(6), 391-397.
- Park, S., Kim, K. S., Kim, J. T., Kang, D., & Sung, K. (2011). Effects of humic acid on phytodegradation of petroleum hydrocarbons in soil simultaneously contaminated with heavy metals. *Journal of environmental sciences*, 23(12), 2034-2041. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60670-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60670-5)
- Parvin, A., Moniruzzaman, M., Hossain, M. K., Saha, B., Parvin, A., Suchi, P. D., & Hoque, S. (2022). Chemical Speciation and Potential Mobility of Heavy Metals in Organic Matter Amended Soil. *Applied and Environmental Soil Science*, 2022, 1- 13. <https://doi.org/10.1155/2022/2028860>
- Patel, K. S., Pandey, P. K., Martín-Ramos, P., Corns, W. T., Varol, S., Bhattacharya, P., & Zhu, Y. (2023). A review on arsenic in the environment: Contamination, mobility, sources, and exposure. *RSC advances*, 13(13), 8803-8821. <https://doi.org/10.1039/D3RA00789H>
- Pathak, P., & Bhattacharya, D. (2021). Phytoextraction of heavy metals by weeds: Physiological and molecular intervention. In *Handbook of Bioremediation* (pp. 49-59). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819382-2.00004-1>
- Peng, Y., Chang, X., & Lang, M. (2021). Iron homeostasis disorder and Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12442. <https://doi.org/10.3390/ijms222212442>
- Pereira, M. G., de Oliveira, F. S., da Silva, R. C., Junior, C. R. P., da Silva Neto, E. C., de Souza, J. J. L. L., Schiavo, J. A., de Souza Oliveira, N., & do Nascimento, C. W. R. (2024). Parent materials influence in the formation of vertical textural differentiation in humid tropical landscapes. *Catena*, 242, 108127. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2024.108127>
- Pérez-Cid, B., Lavilla, I., & Bendicho, C. (1998). Speeding up of a three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound. *Analytica chimica acta*, 360(1-3), 35-41. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00718-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00718-6)
- Pérez-Sirvent, C., Hernández-Pérez, C., Martínez-Sánchez, M. J., García-Lorenzo, M. L., & Bech, J. (2016). Geochemical characterisation of surface waters, topsoils and efflorescences in a historic metal-mining area in Spain. *Journal of Soils and Sediments*, 16(4), 1238- 1252. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1141-3>
- Perin, G., Craboledda, L., Lucchese, M., Cirillo, R., & Dotta, L. (1985). Heavy metal speciation in the sediments of Northern Adriatic Sea : A new approach for environmental toxicity determination
- Peters, S. E., Walton, C. R., Husson, J. M., Quinn, D. P., Shorttle, O., Keller, C. B., & Gaines, R. R. (2021). Igneous rock area and age in continental crust. *Geology*, 49(10), 1235-1239. <https://doi.org/10.1130/G49037.1>

Références bibliographiques

- Phang, L.-Y., Mingyuan, L., Mohammadi, M., Tee, C.-S., Yuswan, M. H., Cheng, W.-H., & Lai, K.-S. (2024). Phytoremediation as a viable ecological and socioeconomic management strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(38), 50126–50141. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34585-z>
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362–370. *Plant Soil*, 287, 77-84.
- Piotrowska-Długosz, A., & Charzyński, P. (2015). The impact of the soil sealing degree on microbial biomass, enzymatic activity, and physicochemical properties in the Ekranic Technosols of Toruń (Poland). *Journal of Soils and Sediments*, 15, 47-59. <https://doi.org/10.1007/s11368-014-0963-8>
- Piqué, A., Tricart, P., Guiraud, R., Laville, E., Bouaziz, S., Amrhar, M., & Ouali, R. A. (2002). The mesozoic-cenozoic Atlas belt (north Africa): an overview. *Geodinamica Acta*, 15(3), 185-208. <https://doi.org/10.1080/09853111.2002.10510752>
- Pollard, A. J., Stewart, H. L., & Roberson, C. B. (2009). Manganese hyperaccumulation in *Phytolacca americana* L. from the Southeastern United States. *Northeastern Naturalist*, 16(sp5), 155-162. <https://doi.org/10.1656/045.016.0513>
- Ponthieu, M. (2003). Spéciation des éléments traces métalliques dans les sols et les solutions des sols: du modèle au terrain (Doctoral dissertation, Aix-Marseille 3).
- Prakash, S., & Verma, A. K. (2021). Arsenic : It's Toxicity and Impact on Human Health. *International Journal of Biological Innovations*, 3(1), 38-47 <https://doi.org/10.46505/IJBI.2021.3102>
- Prasad, V., Chaudhary, S., & Singh, A. (2018). Improving phosphorus fertility in soil through microbial mediators. *International Journal of Plant and Environment*, 4(02), 74-80. <http://dx.doi.org/10.18811/ijpen.v4i02.9>
- 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. *Analytica chimica acta*, 504(2), 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.047>
- Puglisi, E., Del Re, A. A. M., Rao, M. A., & Gianfreda, L. J. S. B. (2006). Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1673-1681. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.021>
- Qafoku, N. P. (2014). Overview of different aspects of climate change effects on soils (No. PNNL-23483). Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States). <https://doi.org/10.2172/1167316>
- Qasim, B. H. (2015). Détermination, spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminés et technosols (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- Qin, J., Jiang, X., Yan, Z., Zhao, H., Zhao, P., Yao, Y., & Chen, X. (2023). Heavy metal content and microbial characteristics of soil plant system in Dabaoshan mining area, Guangdong Province. *PloS one*, 18(6), e0285425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285425>
- Qiu, J., De Souza, M. F., Wang, X., Ok, Y. S., & Meers, E. (2024). Influence of biochar addition and plant management (cutting and time) on ryegrass growth and migration of As and Pb during phytostabilization. *Science of the Total Environment*, 913, 169771. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169771>
- Que, W., Yi, L., Wu, Y., & Li, Q. (2024). Analysis of heavy metals in sediments with different particle sizes and influencing factors in a mining area in Hunan Province. *Scientific Reports*, 14(1), 20318. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-71502-3>
- Quiroz, I. A., Espinoza, S. E., Yáñez, M. A., Martínez, E. E., Magni, C. R., & Faúndez, Á. F. (2024). Potential of *Pinus radiata*, *Eucalyptus globulus* and *Acacia dealbata* for the long-term phytostabilization of copper mine tailings. *International Journal of Phytoremediation*, 26(10), 1537-1544. <https://doi.org/10.1080/15226514.2024.2331716>
- Rabbi, S. M., Minasny, B., McBratney, A. B., & Young, I. M. (2020). Microbial processing of organic matter drives stability and pore geometry of soil aggregates. *Geoderma*, 360, 114033. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114033>
- Radziemska, M., Gusiati, M. Z., Cydzik-Kwiatkowska, A., Blazejczyk, A., Kumar, V., Kintl, A., & Brtnicky, M. (2022). Effect of biochar on metal distribution and microbiome dynamic of a phytostabilized metalloid-contaminated soil following freeze-thaw cycles. *Materials*, 15(11), 3801. <https://doi.org/10.3390/ma15113801>
- Radziemska, M., Gusiati, Z. M., Mazur, Z., Hammerschmidt, T., Bęś, A., Kintl, A., ... & Brtnicky, M. (2021). Biochar-assisted phytostabilization for potentially toxic element immobilization. *Sustainability*, 14(1), 445. <https://doi.org/10.3390/su14010445>

Références bibliographiques

- Rahman, Z., & Singh, V. P. (2020). Bioremediation of toxic heavy metals (THMs) contaminated sites: concepts, applications and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22), 27563-27581. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08903-0>
- Raj, N., Selvakumar, S., Soundara, B., & Kulanthaivel, P. (2023). Sustainable utilization of biopolymers as green adhesive in soil improvement: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(56), 118117-118132. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30642-1>
- Rajendran, S., Priya, T. A. K., Khoo, K. S., Hoang, T. K., Ng, H. S., Munawaroh, H. S. H., ... & Show, P. L. (2022). A critical review on various remediation approaches for heavy metal contaminants removal from contaminated soils. *Chemosphere*, 287, 132369. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132369>
- Rajkumar, M., Ma, Y., & Freitas, H. (2008). Characterization of metal-resistant plant-growth promoting *Bacillus weihenstephanensis* isolated from serpentine soil in Portugal. *Journal of Basic Microbiology*, 48(6), 500-508. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800073>
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., ... & Mandzhieva, S. (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology*, 10(4), 267. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
- Rakotondrabe, F., Ngoupayou, J. R. N., Mfonka, Z., Rasolomanana, E. H., Abolo, A. J. N., Asone, B. L., Ako, A. A., & Rakotondrabe, M. H. (2017). Assessment of surface water quality of Bétaré-Oya gold mining area (East-Cameroon). *Journal of Water Resource and Protection*, 9(8), 960-984. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2017.98064>
- Ramírez-Zamora, J., Mussali-Galante, P., Rodríguez, A., Castrejón-Godínez, M. L., Valencia-Cuevas, L., & Tovar-Sánchez, E. (2022). Assisted phytostabilization of mine-tailings with *Prosopis laevigata* (Fabaceae) and biochar. *Plants*, 11(24), 3441. <https://doi.org/10.3390/plants11243441>
- Ramli, M., & Saputra, A. (2023). Water Chemical Analysis of Surface Water Runoff from Iron Ore Mine Void at Tanjung-Bone, South Sulawesi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1272(1), 012035. DOI 10.1088/1755-1315/1272/1/012035
- Ramli, M., & Saputra, A. (2025). Hydrochemical analysis of surface water flow from an abandoned iron ore mine. *Mining of Mineral Deposits*, 19(1). DOI: 10.33271/mining19.01.065
- Ramos, W., Gutierrez, E. L., De La Cruz-Vargas, J. A., Díaz, J., Hurtado, J., Ronceros, G., & De Vries, E. (2022). Exposure to Atmospheric Ozone Disruption and Altitude Over 3500 m.a.s.l. Are Associated with a Higher Prevalence of Photodermatoses in Pediatric Population of High-Altitude in Peru. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, Volume 15, 1779-1786. <https://doi.org/10.2147/CCID.S374884>
- Randive, V. S., Agnihotri, S. N., & Bhagat, R. B. (2024). Screening and Optimization of IAA Production by PGPR Isolated from Rhizosphere of a *Pterocarpus marsupium* Roxb. and their Effect on Plant Growth. *Current Agriculture Research Journal*, 12(1). <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.12.1.26>
- Ranjan, A., Rajput, V. D., Prazdnova, E. V., Gurnani, M., Sharma, S., Bhardwaj, P., ... & Wong, M. H. (2024). Augmenting abiotic stress tolerance and root architecture: The function of phytohormone-producing PGPR and their interaction with nanoparticles. *South African Journal of Botany*, 167, 612-629. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.02.041>
- Rao, M. A., Violante, A., & Gianfreda, L. (2000). Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(7), 1007-1014. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00010-9)
- Rathi, A., Kumar, P., Nangla, S., Sharma, S., & Sharma, S. (2024). Soil restoration strategies for sustaining soil productivity: a review. *Asian Res J Agric*, 17(1), 33-48. DOI: 10.9734/ARJA/2024/v17i1408
- Rauschkolb, R., Bucher, S. F., Hensen, I., Ahrends, A., Fernández-Pascual, E., Heubach, K., Jakubka, D., Jiménez-Alfaro, B., König, A., Koubek, T., Kehl, A., Khuroo, A. A., Lindstädter, A., Shafee, F., Mašková, T., Platonova, E., Panico, P., Plos, C., Primack, R., ... Römermann, C. (2024). Spatial variability in herbaceous plant phenology is mostly explained by variability in temperature but also by photoperiod and functional traits. *International Journal of Biometeorology*, 68(4), 761-775. <https://doi.org/10.1007/s00484-024-02621-9>
- Rawat, K., Sharma, N., & Singh, V. K. (2022). X-Ray fluorescence and comparison with other analytical methods (AAS, ICP-aes, la-ICP-ms, IC, LIBS, SEM-EDS, and XRD). *X-Ray Fluorescence in Biological Sciences: Principles, Instrumentation, and Applications*, 1-20. <https://doi.org/10.1002/9781119645719.ch1>

Références bibliographiques

- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. (2020). Phosphate-Solubilizing Microorganisms : Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>
- Rehman, M., Pan, J., Mubeen, S., Ma, W., Luo, D., Cao, S., ... & Chen, P. (2023). Biochar assisted phyto-stabilization of Cd and Pb contaminated mining soil using Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23(4), 4955-4970. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01498-8>
- Reichman, S. M., & Parker, D. R. (2005). Metal complexation by phytosiderophores in the rhizosphere. In *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere* (pp. 129-156). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044451997-9/50006-4>
- Ren, C., Xiao, J.-H., Li, J.-T., Du, Q.-Q., Zhu, L.-W., Wang, H., Zhu, R.-Z., & Zhao, H.-Y. (2022). Accumulation and transport characteristics of Cd, Pb, Zn, and As in different maize varieties. *Huan Jing Ke Xue= Huanjing Kexue*, 43(8), 4232-4252. <https://doi.org/10.13227/j.hj.kx.202107117>
- Rhoades, J. D., Chanduvi, F., & Lesch, S. M. (1999). Soil salinity assessment: Methods and interpretation of electrical conductivity measurements (Vol. 57). Food & Agriculture Org.
- Riaz, M., Kamran, M., Fang, Y., Wang, Q., Cao, H., Yang, G., ... & Wang, X. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated soils: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123919. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123919>
- Riaz, U., Murtaza, G., Anum, W., Samreen, T., Sarfraz, M., & Nazir, M. Z. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides. *Microbiota and biofertilizers: a sustainable continuum for plant and soil health*, 181-196. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_11
- Ribeiro-Barros, A. I., Catarino, S., Moura, I., Ramalho, J. C., Romeiras, M. M., & Ghodhbane-Gtari, F. (2019). Actinorhizal trees and shrubs from Africa: distribution, conservation and uses. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112, 31-46. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1174-x>
- Riley, I. T., Olowu, E., Jawneh, K., & Atli, M. (2021). Actinorhizal plants of Turkey: formation of nodules, cluster roots and ectomycorrhizal roots. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 34(3), 307-313. <https://doi.org/10.29136/mediterranean.972937>
- Roberts, S. K. (2006). Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist*, 169(4), 647-666. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2006.01639.X>
- Rizvi, A., Ahmed, B., Khan, M. S., El-Beltagi, H. S., Umar, S., & Lee, J. (2022). Bioprospecting plant growth promoting rhizobacteria for enhancing the biological properties and phytochemical composition of medicinally important crops. *Molecules*, 27(4), 1407. <https://doi.org/10.3390/molecules27041407>
- Robbins, N. E., Trontin, C., Duan, L., & Dinnyen, J. R. (2014). Beyond the barrier: communication in the root through the endodermis. *Plant physiology*, 166(2), 551-559. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244871>
- Robert, M., & Chenu, C. (2021). Interactions between soil minerals and microorganisms. In *Soil biochemistry* p. 307-404.
- Robert, M., Veneau, G., & Berrier, J. (1980). Solubilisation comparée des silicates, carbonates et hydroxydes en fonction des conditions du milieu. *Bulletin de Minéralogie*, 103(3), 324-329.
- Rodier, J., Bazin, C., Broutin, J. P., Chambon, P., Champsaur, H., & Rodi, L. (1996). L'analyse de l'eau naturelle, eaux résiduaires, eau de mer. Denod, Paris, 1(1383), 2.
- Rouhani, A., Gutiérrez, M., Newton, R. A., & Al Souki, K. S. (2025). An overview of potentially toxic element pollution in soil around lead-zinc mining areas. *Environmental Reviews*, 33, 1-16. <https://doi.org/10.1139/er-2024-0052>
- Rouvier, H. (1994). Notice explicative de la carte géologique de la Tunisie au 1/50000e-Nefza, feuille 10. Office National des Mines, Direction de la Géologie, 48.
- Rouvier, H., Perthuisot, V., & Mansouri, A. (1985). Pb-Zn deposits and salt-bearing diapirs in Southern Europe and North Africa. *Economic Geology*, 80(3), 666-687. <https://doi.org/10.2113/gsecongeo.80.3.666>
- Roux, C. (2002). La réhabilitation des mines et carrières à ciel ouvert. *Bois & forêts des tropiques*, 272, 5-19. <https://doi.org/10.19182/bft2002.272.a20155>
- Roy, S., Bhattacharyya, P., & Ghosh, A. K. (2004). Influence of toxic metals on activity of acid and alkaline phosphatase enzymes in metal-contaminated landfill soils. *Soil Research*, 42(3), 339-344. <https://doi.org/10.1071/SR03044>
- Ruby, M. V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., & Sellstone, C. M. (1996). Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental science & technology*, 30(2), 422-430. <https://doi.org/10.1021/es950057z>

Références bibliographiques

- S, A.-S. M., & Alsalim, H. a. A. (2024). Dectection of genes responsible for heavy metals resistance in locally isolated pseudomonas spp. Iraqi. Journal of agricultural sciences, 55(1), 361-370. <https://doi.org/10.36103/wgz9vb91>
- Saa-Aondo, M., Asose, A., Kalu, K. M., Yelwa, J. M., Abdullahi, S., Chinedu, E. K., & Ndahi, J. A. (2024). Efficiencies of Heavy Metal Hyper-accumulation Plants as Potential Land Remediators for Heavy Metal Polluted Soils. Asian J. Curr. Res, 9(1), 60-70. DOI: 10.56557/AJOCR/2024/v9i18525
- Saadaoui, E., Ben Yahia, K., Chemlali, I., Belaïd, S., & Ben Romdhane, C. (2022). Eucalypt in the Tunisian arid region: diversity and valorization for honey production. International Journal of Agriculture and Nutrition, 4(1), 1-5.
- Sah, D., Verma, P. K., Kumari, K. M., & Lakhani, A. (2019). Chemical fractionation of heavy metals in fine particulate matter and their health risk assessment through inhalation exposure pathway. Environmental Geochemistry and Health, 41(3), 1445-1458. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0223-8>
- Sahraoui, H., Andrade, M. L., Hachicha, M., & Vega, F. A. (2015). Competitive sorption and desorption of trace elements by Tunisian Aridisols Calcorthids. Environmental Science and Pollution Research, 22(14), 10861-10872. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4288-y>
- Sainfeld, P. (1952). Les gîtes plombo-zincifères de Tunisie. Ann. Min. Géol. Tunis, 9, 1-285.
- Salehi, M. (2025). Surface Complexation at Charged Organic Surfaces. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 91(1), 149-173. <https://doi.org/10.2138/rmg.2025.91A.05>
- Salhi, R., Durães, N., Dhaoui, M., Patinha, C., da Silva, E. F., & Mlayah, A. (2023). Contamination assessment and availability of potential toxic elements from the Sidi Driss tailing pile (NW Tunisia) based on geochemical and geophysical methods. Journal of African Earth Sciences, 202, 104921. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2023.104921>
- Santamarina, J. C., Klein, K. A., Wang, Y. H., & Prencke, E. (2002). Specific surface : Determination and relevance. Canadian Geotechnical Journal, 39(1), 233-241. <https://doi.org/10.1139/t01-077>
- Santoro, N., Singer, D. M., Mulvey, B. K., Halasa, K., Teutsch, N., Shedleski, A., & Wood, M. (2024). Neighborhood-scale lead (Pb) speciation in Akron, Ohio (USA) soils : Primary sources, post-deposition diagenesis, and high concentrations of labile Pb. Environmental Geochemistry and Health, 46(5). <https://doi.org/10.1007/s10653-024-01954-z>
- Santos, E. S., Afif, E., & Forján, R. (2024). By-product amendments for the remediation of metal and metalloid contaminated soils. Frontiers in Environmental Science, 12, 1498172. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1498172>
- Savelli, C. (2002). Time-space distribution of magmatic activity in the western Mediterranean and peripheral orogens during the past 30 Ma (a stimulus to geodynamic considerations). Journal of Geodynamics, 34(1), 99-126. [https://doi.org/10.1016/S0264-3707\(02\)00026-1](https://doi.org/10.1016/S0264-3707(02)00026-1)
- Sazykin, I., Khmelevtsova, L., Azhogina, T., & Sazykina, M. (2023). Heavy metals influence on the bacterial community of soils: a review. Agriculture, 13(3), 653. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030653>
- Scarciglia, F., Critelli, S., Borrelli, L., Coniglio, S., Muto, F., & Perri, F. (2016). Weathering profiles in granitoid rocks of the Sila Massif uplands, Calabria, southern Italy : New insights into their formation processes and rates. Sedimentary geology, 336, 46-67. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2016.01.015>
- Schn R, J., & Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Applied and environmental microbiology, 43(6), 1256-1261.
- Sebei, A., Chaabani, A., Abdelmalek, C., Helali, M. A., Dhahri, F., & Chaabani, F. (2020). Evaluation of pollution by heavy metals of an abandoned Pb-Zn mine in northern Tunisia using sequential fractionation and geostatistical mapping. Environmental Science and Pollution Research, 27. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10101-x>
- Sekhohola-Dlamini, L. M., Keshinro, O. M., Masudi, W. L., & Cowan, A. K. (2022). Elaboration of a Phytoremediation Strategy for Successful and Sustainable Rehabilitation of Disturbed and Degraded Land. Minerals, 12(2), 111. <https://doi.org/10.3390/min12020111>
- Senni, R., & Gerard, D. B. A. H. (2020). Biodiversity of halophytes in semi-arid regions case of Zahrez gharbi and Zahrez chergui (Zaafreane_ Djelfa) in Alegeria. Ponte. International Journal of Science and Research, 76(11). DOI: 10.21506/j.ponte.2020.11.13
- Sepehri, M., & Khatabi, B. (2021). Combination of siderophore-producing bacteria and Piriformospora indica provides an efficient approach to improve cadmium tolerance in alfalfa. Microbial Ecology, 81, 717-730. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01629-z>

Références bibliographiques

- Serrano, M. F., López, J. E., Henao, N., & Saldarriaga, J. F. (2024). Phosphorus-loaded biochar-assisted phytoremediation to immobilize cadmium, chromium, and lead in soils. *ACS omega*, 9(3), 3574-3587. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07433>
- Setia, R., Lamba, S., Chander, S., Kumar, V., Singh, R., Litoria, P. K., Singh, R. P., & Pateriya, B. (2021). Spatio-temporal variations in water quality, hydrochemistry and its controlling factors in a perennial river in India. *Applied Water Science*, 11(11), 169. <https://doi.org/10.1007/s13201-021-01504-3>
- Shafiq, M., Alazba, A. A., & Amin, M. T. (2021). Kinetic and isotherm studies of Ni²⁺ and Pb²⁺ adsorption from synthetic wastewater using *Eucalyptus camdulensis*—Derived biochar. *Sustainability*, 13(7), 3785. <https://doi.org/10.3390/su13073785>
- Shafique, M., Jawaid, A., & Rehman, Y. (2017). Redox biotransformation of arsenic along with plant growth promotion by multi-metal resistance *Pseudomonas* sp. MX6. *Comptes Rendus. Biologies*, 340(6-7), 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.05.002>
- Shahid, M., Al-Khattaf, F. S., Danish, M., Zeyad, M. T., Atef Hatamleh, A., Mohamed, A., & Ali, S. (2022). PGPR *Kosakonia radicincitans* KR-17 increases the salt tolerance of radish by regulating ion-homeostasis, photosynthetic molecules, redox potential, and stressor metabolites. *Frontiers in Plant Science*, 13, 919696. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.919696>
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., & Niazi, N. K. (2017). Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of hazardous materials*, 325, 36-58. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.063>
- Shakeela, S., Padder, S. A., & Bhat, Z. A. (2017). Isolation of phosphate solubilising rhizobacteria and endorhizobacteria from medicinal plant *Picrorhiza kurroa* and their optimization for tricalcium phosphate solubilization. *The Pharma Innovation*, 6(6, Part C), 160.
- Sharifi, R., & Ryu, C. M. (2018). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany*, 122(3), 349-358. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy108>
- Sharifi, R., Lee, S. M., & Ryu, C. M. (2018). Microbe-induced plant volatiles. *New Phytologist*, 220(3), 684-691. <https://doi.org/10.1111/nph.14955>
- Sharma, N., Wang, Z., Catalano, J. G., & Giammar, D. E. (2022). Dynamic Responses of Trace Metal Bioaccessibility to Fluctuating Redox Conditions in Wetland Soils and Stream Sediments. *ACS Earth and Space Chemistry*, 6(5), 1331-1344. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.2c00031>
- Sharma, R., Salwan, R., & Sharma, V. (2023b). Biology of nitrogen fixation in *Frankia*. In *The Chemical Dialogue Between Plants and Beneficial Microorganisms* (pp. 271-281). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91734-6.00016-8>
- Sharma, S., Kumar, A., Chauhan, M., Chauhan, D., & Garg, V. (2023a). Role and applications of microbial siderophores in the environment. *Ecol Environ Conserv*, 29, 33-40. <https://doi.org/10.53550/eec.2023.v29i01.004>
- Shaw, G. S. (1993). The effect of processing variables on steel surface chemistry. Case Western Reserve University.
- Shen, Z., Chen, Y., Xu, D., Li, L., & Zhu, Y. (2020). Interactions between heavy metals and other mineral elements from soil to medicinal plant *Fengdan* (*Paeonia ostii*) in a copper mining area, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(27), 33743-33752. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09358-z>
- Shi, M., Min, X., Ke, Y., Lin, Z., Yang, Z., Wang, S., ... & Wei, Y. (2021). Recent progress in understanding the mechanism of heavy metals retention by iron (oxyhydr) oxides. *Science of the Total Environment*, 752, 141930. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141930>
- Shi, W., Ju, Y., Bian, R., Li, L., Joseph, S., Mitchell, D. R., ... & Pan, G. (2020). Biochar bound urea boosts plant growth and reduces nitrogen leaching. *Science of the Total Environment*, 701, 134424. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134424>
- Shilpa, Sharma, A. K., Chauhan, M., & Bijalwan, P. (2024). Plant growth promoting rhizobacteria, organic manures, and chemical fertilizers : Impact on crop productivity and soil health of capsicum (*Capsicum annuum* L.) in North Western Himalayan region. *Journal of Plant Nutrition*, 47(3), 448-467. <https://doi.org/10.1080/01904167.2023.2280120>
- Shumaila, Ullah, S., & Nafees, M. (2023). Biochar Application to Soil and Seed Pre-Soaking on Growth, Yield and Physiological Response of *Solanum melongena* L. Under Induced Abiotic Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(11), 6980-7003. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-10990-5>
- Shuman, L. M. (1985). Fractionation method for soil microelements. *Soil science*, 140(1), 11-22.

Références bibliographiques

- Singh, T. B., Ali, A., Prasad, M., Yadav, A., Shrivastav, P., Goyal, D., & Dantu, P. K. (2020). Role of organic fertilizers in improving soil fertility. *Contaminants in agriculture: sources, impacts and management*, 61-77. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_3
- Siyar, R., Doulati Ardejani, F., Norouzi, P., Maghsoudy, S., Yavarzadeh, M., Taherdangkoo, R., & Butscher, C. (2022). Phytoremediation potential of native hyperaccumulator plants growing on heavy metal-contaminated soil of Khatunabad copper smelter and refinery, Iran. *Water*, 14(22), 3597. <https://doi.org/10.3390/w14223597>
- Slaimi, R., Abassi, M., & Béjaoui, Z. (2021). Assessment of *Casuarina glauca* as biofiltration model of secondary treated urban wastewater: effect on growth performances and heavy metals tolerance. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(10), 653. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09438-8>
- Slaimi, R., Abassi, M., Laamari, I., & Béjaoui, Z. (2022). Effects of irrigation with urban treated wastewater on the morpho-physiology, accumulation of heavy metals and biochemical traits of *Casuarina glauca* sieb.
- Smieja-Król, B., Fiałkiewicz-Kozieł, B., Kądziołka-Gaweł, M., Kubacki, J., Prokopowicz, A., Smieja, A., & Siepak, M. (2024). Self-stabilization of Zn, Pb, Cd, and As in smelter-impacted organic-rich soil : The effect of hydrous Fe oxides and ZnCd sulfide coprecipitation. *Chemical Geology*, 643, 121833. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2023.121833>
- Soltani, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Sorooshian, A., & Ahmadi, M. R. (2017). Distribution of potentially toxic elements (PTEs) in tailings, soils, and plants around Gol-E-Gohar iron mine, a case study in Iran. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(23), 18798-18816. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9342-5>
- Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*, 30(4), 205-240. <https://doi.org/10.1080/10408410490468786>
- Song, J., Shen, Q., Shi, J., Xu, J., Brookes, P. C., & Liu, X. (2021). Changes in microbial community structure due to chronic trace element concentrations in different sizes of soil aggregates. *Environmental Pollution*, 268, 115933. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115933>
- Sönmez, V. Z., Akarsu, C., Altay, M. C., Ercan, N., & Sivri, N. (2025). Can the combination index be used as a new perspective in characterizing the toxicity of metal mixtures? *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-025-06517-y>
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438. doi: 10.1101/cshperspect.a001438
- Sposito, G. (1989). *The chemistry of soils*. Edition Oxford University Press, pp. 277.
- Sridevi, V., & Raghuram, M. (2019). Multiple metal tolerance of *Paenibacillus dentritiformis* isolated from metal contaminated soils west Godavari district (Andhra Pradesh) : Multiple metal tolerance of *paenibacillus dentritiformis*. *Journal of Applied and Natural Science*, 11(2), 486-491. <https://doi.org/10.31018/jans.v11i2.2094>
- Stange, M., Barrett, R. D., & Hendry, A. P. (2021). The importance of genomic variation for biodiversity, ecosystems and people. *Nature Reviews Genetics*, 22(2), 89-105. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00288-7>
- Stefanov, S. H., & Ouchev, A. (1972). Gisement plombo-zincifère de Sidi Driss. Rapport géol. avec estimation de réserves. Rapport interne, Office National des Mines de Tunisie.
- Stroud, J. L., Low, A., Collins, R. N., & Manefield, M. (2014). Metal(loid) Bioaccessibility Dictates Microbial Community Composition in Acid Sulfate Soil Horizons and Sulfidic Drain Sediments. *Environmental Science & Technology*, 48(15), 8514-8521. <https://doi.org/10.1021/es501495s>
- Sui, X., Wang, J., Zhao, Z., Liu, B., Liu, M., Liu, M., Shi, C., Feng, X., Fu, Y., Shi, D., Li, S., Qi, Q., Xian, M., & Zhao, G. (2024). Phenolic compounds induce ferroptosis-like death by promoting hydroxyl radical generation in the Fenton reaction. *Communications Biology*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-05903-5>
- Sun, J., Yang, L., Wei, J., Quan, J., & Yang, X. (2020). The responses of soil bacterial communities and enzyme activities to the edaphic properties of coal mining areas in Central China. *PLoS One*, 15(4), e0231198. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0231198>
- Sun, W., Sun, J., Ding, Q., Qi, M., Zhou, J., Shi, Y., Liu, J., Won, M., Sun, X., Bai, X., Dong, B., Kim, J. S., & Wang, L. (2024). Breaking Iron Homeostasis : Iron Capturing Nanocomposites for Combating Bacterial Biofilm. *Angewandte Chemie*, 136(14), e202319690. <https://doi.org/10.1002/ange.202319690>

Références bibliographiques

- Sung, J., Zhang, L., Tian, C., Shen, Y. R., & Waychunas, G. A. (2011). Effect of pH on the water/ α -Al₂O₃ (1102) interface structure studied by sum-frequency vibrational spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(28), 13887-13893. <https://doi.org/10.1021/JP2046596>
- Surenbaatar, U., Lee, S., Kwon, J.-Y., Lim, H., Kim, J.-J., Kim, Y.-H., & Hong, Y.-S. (2023). Bioaccumulation of lead, cadmium, and arsenic in a mining area and its associated health effects. *Toxics*, 11(6), 519. <https://doi.org/10.3390/toxics11060519>
- Swanson, G., Langman, J. B., Child, A. W., Wilhelm, F. M., & Moberly, J. G. (2023). Iron and manganese oxidation states, bonding environments, and mobility in the mining-impacted sediments of coeur d' alene lake, idaho : Core experiments. *Hydrology*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.3390/hydrology10010023>
- Talukder, R., Rabbi, M. H., Baharim, N. B., & Carnicelli, S. (2022). Source identification and ecological risk assessment of heavy metal pollution in sediments of Setiu wetland, Malaysia. *Environmental Forensics*, 23(1-2), 241-254. <https://doi.org/10.1080/15275922.2021.1892871>
- Tang, Y., Xing, Y., Wang, X., Ya, H., Zhang, T., Lv, M., ... & Jiang, B. (2024). PET microplastics influenced microbial community and heavy metal speciation in heavy-metal contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 201, 105488. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2024.105488>
- Tao, H., Liao, X., Cao, H., Zhao, D., & Hou, Y. (2022). Three-dimensional delineation of soil pollutants at contaminated sites: Progress and prospects. *Journal of Geographical Sciences*, 32(8), 1615-1634. <https://doi.org/10.1007/s11442-022-2013-6>
- Tariq, A., & Ahmed, A. (2024). Phosphate solubilization potential of PSB: an advance approach to enhance phosphorous availability for phytostimulation. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(44), 56174-56193. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3463966/v1>
- Tauqeer, H. M., Fatima, M., Rashid, A., Shahbaz, A. K., Ramzani, P. M. A., Farhad, M., ... & Iqbal, M. (2021). The current scenario and prospects of immobilization remediation technique for the management of heavy metals contaminated soils. *Approaches to the remediation of inorganic pollutants*, 155-185. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6221-1_8
- Tessier, A. P. G. C., Campbell, P. G., & Bisson, M. J. A. C. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical chemistry*, 51(7), 844-851. <https://doi.org/10.1021/ac50043a017>
- Thorgersen, M. P., Goff, J. L., Poole II, F. L., Walker, K. F., Putt, A. D., Lui, L. M., Hazen, T. C., Arkin, A. P., & Adams, M. W. (2023). Mixed nitrate and metal contamination influences operational speciation of toxic and essential elements. *Environmental Pollution*, 338, 122674. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122674>
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., & Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, 10(2), 158. <https://doi.org/10.3390/biology10020158>
- Tian, M., Wang, X., Liu, F., Hu, Q., Qiao, Y., & Wang, Q. (2023). Spatial-temporal variability and influence factors of Cd in soils of Guangxi, China. *PLOS ONE*, 18(1), e0279980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279980>
- Tian, S., Shu, X., Jiang, X., Zhang, H., Ma, X., Teng, Z., & Li, T. (2025). Mineralization and stabilization of toxic Pb²⁺ ions using CMC loaded S/P co-doped biochar composite. *Separation and Purification Technology*, 354, 129161. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.129161>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022). Bacterial siderophores: classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants*, 11(22), 3065. <https://doi.org/10.3390/plants11223065>
- Timofeeva, Y., Karabtsov, A., Burdukovskii, M., & Vzorova, D. (2024). Strontium and vanadium sorption by iron-manganese nodules from natural and remediated Dystric Cambisols. *Journal of Soils and Sediments*, 24(3), 1220-1236. <https://doi.org/10.1007/s11368-024-03714-z>
- Timothy, N. A., & Williams, E. T. (2019). Environmental pollution by heavy metal: an overview. *International Journal of Environmental Chemistry*, 3(2), 72-82. doi: 10.11648/j.ijec.20190302.14
- Tlil, H., Souissi, R., Souissi, F., Lattanzi, P., Podda, F., Concas, S., ... & Cidu, R. (2017). Environmental mineralogy and geochemistry of Pb-Zn mine wastes, Northern Tunisia. *Rendiconti Lincei*, 28, 133-141. <https://doi-org.ezproxy.univ-orleans.fr/10.1007/s12210-016-0585-8>
- Tokalioğlu, Ş. (2023). Bioaccessibility of Cu, Mn, Fe, and Zn in fruit and vegetables by the in vitro UBM and statistical evaluation of the results. *Biological Trace Element Research*, 201(3), 1538-1546. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03253-z>

Références bibliographiques

- Tomlinson, D. L., Wilson, J. G., Harris, C. R., & Jeffrey, D. W. (1980). Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 33(1-4), 566-575. <https://doi.org/10.1007/bf02414780>
- Trasar-Cepeda, C., Leiros, M. C., Seoane, S., & Gil-Sotres, F. (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13), 1867-1875. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00160-7)
- Trifi, M., Charef, A., Dermech, M., Azouzi, R., Chalhoun, A., Hjiri, B., & Sassi, M. B. (2019). Trend evolution of physicochemical parameters and metals mobility in acidic and complex mine tailings long exposed to severe Mediterranean climatic conditions: Sidi Driss tailings case (NW-Tunisia). *Journal of African Earth Sciences*, 158, 103509. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2019.05.017>
- Trifi, M., Dermech, M., Abdelkrim, C., Azouzi, R., & Hjiri, B. (2018). Extraction procedures of toxic and mobile heavy metal fraction from complex mineralogical tailings affected by acid mine drainage. *Arabian Journal of Geosciences*, 11(12), 328. <https://doi.org/10.1007/s12517-018-3612-5>
- Trifi, M., Gasmi, A., Carbone, C., Majzlan, J., Nasri, N., Dermech, M., ... & Elfil, H. (2022). Machine learning-based prediction of toxic metals concentration in an acid mine drainage environment, northern Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(58), 87490-87508. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21890-8>
- Trivedi, P., Axe, L., & Dyer, J. (2001). Adsorption of metal ions onto goethite: single-adsorbate and competitive systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 191(1-2), 107-121. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00768-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00768-3)
- Turner, B. L., Hopkins, D. W., Haygarth, P. M., & Ostle, N. (2002). β -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20(2), 157-162. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00020-3)
- Tytła, M. (2019). Assessment of Heavy Metal Pollution and Potential Ecological Risk in Sewage Sludge from Municipal Wastewater Treatment Plant Located in the Most Industrialized Region in Poland—Case Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132430>
- U.S. National Research Council. (1984). *Casuarinas: Nitrogen-fixing trees for adverse sites*. National Academy Press, Washington D.C.
- Upadhyay, V., Choudhary, K. K., & Agrawal, S. B. (2024). Use of biochar as a sustainable agronomic tool, its limitations and impact on environment: A review. *Discover Agriculture*, 2(1), 20. <https://doi.org/10.1007/s44279-024-00033-2>
- US EPA. (1986). *Quality Criteria for Water*. Technical Report. Washington DC: Office of Water Regulations and Standards,
- USEPA. (1989). *Risk assessment guidance for superfund. Human health evaluation manual (Part A) (Vol. 1)*. Washington, DC: Office of Emergency and Remedial Response.
- USEPA. (2002). *Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites*. Washington : U. S. Environmental Protection Agency, Office of Emergency and Remedial Response.
- Usman, K., Al Jabri, H., Abu-Dieyeh, M. H., & Alsafran, M. H. (2020). Comparative assessment of toxic metals bioaccumulation and the mechanisms of chromium (Cr) tolerance and uptake in *Calotropis procera*. *Frontiers in plant science*, 11, 883. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00883>
- Van Huyssteen, I., Mulidzi, A. R., Meyer, A. H., & Wooldridge, J. (2020). Alteration index three facilitates interpretation of β -Glucosidase, acid-phosphatase and urease activities in soils irrigated with diluted winery wastewater. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 41(2), 238-244. <https://doi.org/10.21548/41-2-4195>
- Van Olphen, H. (1960). Ion adsorption on clays: A review. *Clays and Clay Minerals*, 115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-009351-2.50016-7>
- Várallyay, S., Bódi, É., Balla Kovács, A., Soós, Á., Mukarram, S. A., & Kovács, B. (2024). Arsenic Uptake and Distribution in Green Pea Plants Under Arsenite and Arsenate Treatments. *Horticulturae*, 10(11), 1127. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10111127>
- Varela, M. F., Stephen, J., Bharti, D., Lekshmi, M., & Kumar, S. (2023). Inhibition of Multidrug Efflux Pumps Belonging to the Major Facilitator Superfamily in Bacterial Pathogens. *Biomedicines*, 11(5), 1448. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051448>

Références bibliographiques

- Varshney, A., Mohan, S., & Dahiya, P. (2021). Growth and antioxidant responses in plants induced by heavy metals present in fly ash. *Energy, Ecology and Environment*, 6(2), 92–110. <https://doi.org/10.1007/s40974-020-00191-1>
- Vélez, J. M. B., Martínez, J. G., Ospina, J. T., & Agudelo, S. O. (2021). Bioremediation potential of *Pseudomonas* genus isolates from residual water, capable of tolerating lead through mechanisms of exopolysaccharide production and biosorption. *Biotechnology Reports*, 32, e00685. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00685>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255, 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Violante, A., Krishnamurti, G. S. R., & Pigna, M. (2008). Factors affecting the sorption-desorption of trace elements in soil environments. *Biophysico-chemical processes of heavy metals and metalloids in soil environments*, 169–214. DOI:10.1002/9780470175484
- Virpiranta, H., Banasik, M., Taskila, S., Leiviskä, T., Halttu, M., Sotaniemi, V. H., & Tanskanen, J. (2020). Isolation of efficient metal-binding bacteria from boreal peat soils and development of microbial biosorbents for improved nickel scavenging. *Water*, 12(7), 2000. <https://doi.org/10.3390/W12072000>
- Vitecek, J., Petřilová, J., Adam, V., Havel, L., Kramer, K. J., Babula, P., & Kizek, R. (2007). A fluorimetric sensor for detection of one living cell. *Sensors*, 7(3), 222–238.
- Vocciante, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., & Franchi, E. (2022). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Applied sciences*, 12(3), 1231.
- Voelz, J. L., Johnson, N. W., Chun, C. L., Arnold, W. A., & Penn, R. L. (2019). Quantitative dissolution of environmentally accessible iron residing in iron-rich minerals: a review. *ACS Earth and Space Chemistry*, 3(8), 1371–1392. DOI: 10.1021/acsearthspacechem.9b00012
- Wade, J., Li, C., Vollbracht, K., Hooper, D. G., Wills, S. A., & Margenot, A. J. (2021). Prescribed pH for soil β -glucosidase and phosphomonoesterase do not reflect pH optima. *Geoderma*, 401, 115161. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115161>
- Wall, L. G. (2000). The actinorhizal symbiosis. *Journal of plant growth regulation*, 19, 167–182. <https://doi.org/10.1007/s003440000027>
- Walraven, N., Bakker, M., van Os, B. J. H., Klaver, G. Th., Middelburg, J. J., & Davies, G. R. (2015). Factors controlling the oral bioaccessibility of anthropogenic Pb in polluted soils. *Science of The Total Environment*, 506–507, 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.118>
- Wang, D., Chen, H., Xin, C., Yuan, Y., Sun, Q., Cao, C., Chao, H., Wu, T., & Zheng, S. (2024). Insight into adsorption of Pb(II) with wild resistant bacteria TJ6 immobilized on biochar composite : Roles of bacterial cell and biochar. *Separation and Purification Technology*, 331, 125660. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.125660>
- Wang, G., Zhao, X., Luo, W., Yuan, J., Guo, Y., Ji, X., ... & Teng, Z. (2022b). Noval porous phosphate-solubilizing bacteria beads loaded with BC/nZVI enhanced the transformation of lead fractions and its microecological regulation mechanism in soil. *Journal of Hazardous Materials*, 437, 129402. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129402>
- Wang, M., Gu, Z., Wang, R., Guo, J., Ling, N., Firbank, L. G., & Guo, S. (2019). Plant primary metabolism regulated by nitrogen contributes to plant–pathogen interactions. *Plant and Cell Physiology*, 60(2), 329–342. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy211>
- Wang, P., Shen, X., Qiu, S., Zhang, L., Ma, Y., & Liang, J. (2024). Clay-based materials for heavy metals adsorption : Mechanisms, advancements, and future prospects in environmental remediation. *Crystals*, 14(12), 1046. <https://doi.org/10.3390/cryst14121046>
- Wang, Y., Huang, W., Li, Y., Yu, F., & Penttinen, P. (2022a). Isolation, characterization, and evaluation of a high-siderophore-yielding bacterium from heavy metal–contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 3888–3899. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15996-8>
- Wang, Y., Huang, Z., Sheng, L., & Ma, Y. (2023). Effect of modified humic acid residue on the adsorption and passivation of Hg^{2+}/Pb^{2+} in solution and soil. *Journal of Molecular Liquids*, 377, 121581. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121581>
- Wei, Z., Zhu, Y., Wang, Y., Song, Z., Wu, Y., Ma, W., ... & Yang, Y. (2022). Influence of Soil Colloids on Ni Adsorption and Transport in the Saturated Porous Media: Effects of pH, Ionic Strength, and Humic Acid. *Applied Sciences*, 12(13), 6591. <https://doi.org/10.3390/app12136591>

Références bibliographiques

- Whitaker, A. H., & Duckworth, O. W. (2018). Cu, Pb, and Zn sorption to biogenic iron (oxyhydr) oxides formed in circum neutral environments. *Soil Systems*, 2(2), 18. <https://doi.org/10.3390/SOILSYSTEMS2020018>
- Wiatrowska, K., Komisarek, J., & Dluzewski, P. (2015). Effects of heavy metals on the activity of dehydrogenases, phosphatases and urease in naturally and artificially contaminated soils. *Journal of Elementology*, 20(3). DOI: 10.5601/jelem.2014.19.2.675
- Widyasari, N. L., Rai, I. N., Dharma, I. G. B., & Mahendra, M. S. (2024). Study of controlling the content of Pb, Cu, Cd, and Cr in soils using hyperaccumulator plants. *Journal of Degraded & Mining Lands Management*, 11(2). doi:10.15243/jdmlm.2024.112.5159
- Wilson, K.L. (1997). *Casuarinaceae* R. Brown: She-oak or Casuarina Family. *Flora of North America Editorial Committee (ed.), Flora of North America, North of Mexico, volume 3*, Oxford University Press, New York
- Wu, Y., Yan, Y., Wang, Z., Tan, Z., & Zhou, T. (2024). Biochar application for the remediation of soil contaminated with potentially toxic elements: Current situation and challenges. *Journal of Environmental Management*, 351, 119775. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119775>
- Xie, K., Xie, N., Liao, Z., Luo, X., Peng, W., & Yuan, Y. (2023). Bioaccessibility of arsenic, lead, and cadmium in contaminated mining/smeltering soils : Assessment, modeling, and application for soil environment criteria derivation. *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130321. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130321>
- Xie, Y., Fan, J., Zhu, W., Amombo, E., Lou, Y., Chen, L., & Fu, J. (2016). Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and bermudagrass genetic variation. *Frontiers in plant science*, 7, 755. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00755>
- Xie, Y., Liu, F., Zhang, X., Jin, Y., Li, Q., Shen, H., Fu, H., & Mao, J. (2022). Benefits and risks of essential trace elements in chronic kidney disease : A narrative review. *Annals of Translational Medicine*, 10(24), 1400. <https://doi.org/10.21037/atm-22-5969>
- Xing, Y.-F., Xu, Y.-H., Shi, M.-H., & Lian, Y.-X. (2016). The impact of PM2.5 on the human respiratory system. *Journal of Thoracic Disease*, 8(1), E69–E74. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.19>
- Xu, D., Li, X., Chen, J., & Li, J. (2023). Research progress of soil and vegetation restoration technology in open-pit coal mine: a review. *Agriculture*, 13(2), 226. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020226>
- Xu, R., Li, J., Li, X., Zhang, J., & Song, W. (2024). Effect of Coal Mining Subsidence on Soil Enzyme Activity in Mining Areas with High Underground Water Levels. *Water*, 16(12), 1704. <https://doi.org/10.3390/w16121704>
- Xu, T., Wang, G., Yin, Q., Zhou, Z., & Deng, N. (2024b). Sulfur/zinc co-doped biochar for stabilization remediation of mercury-contaminated soil: Performance, mechanism and ecological risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 281, 116601. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116601>
- Xu, Y., Shi, H., Fei, Y., Wang, C., Mo, L., & Shu, M. (2021). Identification of Soil Heavy Metal Sources in a Large-Scale Area Affected by Industry. *Sustainability*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/su13020511>
- Xu, Z., Huang, Z., Li, H., Zhu, S., Lei, Z., Liu, C., ... & Feng, C. (2024a). Sulfidation– reoxidation enhances heavy metal immobilization by vivianite. *Water Research*, 263, 122195. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122195>
- Yadav, G., & Meena, M. (2021). Bioprospecting of endophytes in medicinal plants of Thar Desert: An attractive resource for biopharmaceuticals. *Biotechnology Reports*, 30, e00629. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00629>
- Yadav, R., & Ramakrishna, W. (2023). Biochar as an environment-friendly alternative for multiple applications. *Sustainability*, 15(18), 13421. <https://doi.org/10.3390/su151813421>
- Yang, F., Tang, C., & Antonietti, M. (2021). Natural and artificial humic substances to manage minerals, ions, water, and soil microorganisms. *Chemical Society Reviews*, 50(10), 6221–6239. DOI: 10.1039/D0CS01363C
- Yang, G. L., Zheng, M. M., Tan, A. J., Liu, Y. T., Feng, D., & Lv, S. M. (2021b). Research on the mechanisms of plant enrichment and detoxification of cadmium. *Biology*, 10(6), 544. <https://doi.org/10.3390/biology10060544>
- Yang, J., Yang, F., Yang, Y., Xing, G., Deng, C., Shen, Y., ... & Yuan, H. (2016). A proposal of “core enzyme” bioindicator in long-term Pb-Zn ore pollution areas based on topsoil property analysis. *Environmental Pollution*, 213, 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.030>
- Yang, W., Liu, D., Wang, Y., Hussain, B., Zhao, F., Ding, Z., ... & Dawood, M. (2021a). Variations in phytoremediation potential and phytoavailability of heavy metals in different *Salix* genotypes subjected to seasonal flooding. *Journal of Environmental Management*, 299, 113632. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113632>

Références bibliographiques

- Yang, W., Wang, Y., Liu, D., Hussain, B., Ding, Z., Zhao, F., & Yang, X. (2020). Interactions between cadmium and zinc in uptake, accumulation and bioavailability for *Salix integra* with respect to phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 22(6), 628-637. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1701981>
- Yariv, S., & Cross, H. (1979). Colloid geochemistry of clay minerals. *Geochemistry of Colloid Systems: for Earth Scientists*, 287-333. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67041-1_8
- Yeboah, I. B., Tuffour, H. O., Abubakari, A., Melenya, C., Bonsu, M., Quansah, C., & Adjei-Gyapong, T. (2019). Mobility and transport behavior of lead in agricultural soils. *Scientific African*, 5, e00117. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00117>
- Yin, K., Wang, Q., Lv, M., & Chen, L. (2019). Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 360, 1553-1563. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>
- Young, R. E., Gann, G. D., Walder, B., Liu, J., Cui, W., Newton, V., ... & Dixon, K. (2022). International principles and standards for the ecological restoration and recovery of mine sites. *Restoration Ecology*, 30, e13771. <https://doi.org/10.1111/rec.13771>
- Yousfi, R., El Ouear, Z., Dahri, N., Ouddane, B., & Rigane, H. (2019). Evaluating the heavy metals-associated ecological risks in soil and sediments of a decommissioned Tunisian. <https://dx.doi.org/10.15244/pjoes/86198>
- Yuan, Q., Zhang, Y., Wang, T., & Wang, J. (2023). Characterization of heavy metals in fly ash stabilized by carbonation with supercritical CO₂ coupling mechanical force. *Journal of CO₂ Utilization*, 67, 102308. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2022.102308>
- Yukselen, Y., & Kaya, A. (2008). Suitability of the methylene blue test for surface area, cation exchange capacity and swell potential determination of clayey soils. *Engineering Geology*, 102(1-2), 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2008.07.002>
- Zavarzina, D. G., Merkel, A. Y., Klyukina, A. A., Elizarov, I. M., Pikhtereva, V. A., Rusakov, V. S., Chistyakova, N. I., Ziganshin, R. H., Maslov, A. A., & Gavrilov, S. N. (2023). Iron or sulfur respiration—An adaptive choice determining the fitness of a natronophilic bacterium *Dethiobacter alkaliphilus* in geochemically contrasting environments. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1108245>
- Zeng, Y., Fan, Y., Yan, X., Zheng, J., Chen, S. J., & Mai, B. X. (2019). In vitro oral and inhalation bioaccessibility of hydrophobic organic contaminants (HOCs) in airborne particles and influence of relevant parameters. *Environmental Research*, 170, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.025>
- Zhang, D., Ding, A., Li, T., Wu, X., Liu, Y., & Naidu, R. (2021b). Immobilization of Cd and Pb in a contaminated acidic soil amended with hydroxyapatite, bentonite, and biochar. *Journal of Soils and Sediments*, 21, 2262-2272. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129330>
- Zhang, H., & Selim, H. M. (2008). Reaction and transport of arsenic in soils : Equilibrium and kinetic modeling. *Advances in Agronomy*, 98, 45-115. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)00202-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00202-2)
- Zhang, H., Wang, K., Liu, X., Yao, L., Chen, Z., & Han, H. (2024). Exopolysaccharide-Producing Bacteria Regulate Soil Aggregates and Bacterial Communities to Inhibit the Uptake of Cadmium and Lead by Lettuce. *Microorganisms*, 12(11), 2112. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12112112>
- Zhang, J., Noor, Z. Z., Baharuddin, N. H., Setu, S. A., Mohd Hamzah, M. A. A., & Zakaria, Z. A. (2024). Removal of Heavy Metals by *Pseudomonas* sp. – Model Fitting and Interpretation. *Current Microbiology*, 81(10), 312. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03832-4>
- Zhang, L., Dong, Z., Zhang, Y., Wang, L., & Xu, C. (2022, October). Effects of CaCl₂ on concentration and speciation of soil Cd around a Pb-Zn mine. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1087, No. 1, p. 012057). IOP Publishing. DOI 10.1088/1755-1315/1087/1/012057
- Zhang, L., Wen, B., Chen, L., Chen, H., & Wu, K. (2024). Variations in pore structures and permeabilities of ion adsorption rare earth ores during simulated in-situ leaching : Effect of newly formed clay particles and their swelling. *Hydrometallurgy*, 228, 106357. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2024.106357>
- Zhang, P., Duan, W., Peng, H., Pan, B., & Xing, B. (2021a). Functional biochar and its balanced design. *ACS environmental Au*, 2(2), 115-127. <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.1c00032>
- Zhang, Q., & Wang, C. (2020). Natural and Human Factors Affect the Distribution of Soil Heavy Metal Pollution : A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(7). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04728-2>
- Zhang, S., Cheng, L., Zuo, X., Cai, D., Tong, K., Hu, Y., & Ni, J. (2023b). (Fe, Cr)(OH)₃ coprecipitation in solution and on soil: roles of surface functional groups and solution pH. *Environmental Science & Technology*, 57(19), 7516-7525. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c09216>

Références bibliographiques

- Zhang, T., Wang, J., Wang, Y., Fan, X., Liu, Y., & He, J. (2023c). Study on The Mechanism of Cd Absorption in Roots of Suaeda Heteroptera. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3277213/v1>
- Zhang, X., Zeng, L., Wang, Y., Tian, J., Wang, J., Sun, W., ... & Yang, Y. (2023). Selective separation of metals from wastewater using sulfide precipitation: A critical review in agents, operational factors and particle aggregation. *Journal of Environmental Management*, 344, 118462. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118462>
- Zhang, Y., & Dai, M. (2022). Analysis of the Cooling and Humidification Effect of Multi-Layered Vegetation Communities in Urban Parks and Its Impact. *Atmosphere*, 13(12), 2045. <https://doi.org/10.3390/atmos13122045>
- Zhang, Z., & Furman, A. (2021). Soil redox dynamics under dynamic hydrologic regimes-A review. *Science of the Total Environment*, 763, 143026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143026>
- Zhao, D., Wang, P., & Zhao, F. J. (2024). Toxic metals and metalloids in food: Current status, health risks, and mitigation strategies. *Current environmental health reports*, 11(4), 468-483. <https://doi.org/10.1007/s40572-024-00462-7>
- Zhao, M., Li, Y., & Wang, Z. (2022). Mercury and mercury-containing preparations: history of use, clinical applications, pharmacology, toxicology, and pharmacokinetics in traditional Chinese medicine. *Frontiers in pharmacology*, 13, 807807. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.807807>
- Zhao, Q., Guo, W., Wang, B., Zhang, X., & Li, J. (2024). Effect of different calcium salts on phosphorus availability and immobilization of heavy metals in municipal sludge derived biochar. *Journal of Water Process Engineering*, 57, 104708. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104708>
- Zhao, X., Huang, J., Lu, J., & Sun, Y. (2019). Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.136>
- Zhao, X., Sun, Y., Huang, J., Wang, H., & Tang, D. (2020). Effects of soil heavy metal pollution on microbial activities and community diversity in different land use types in mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 20215-20226. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08538-1>
- Zhen, Z., Wang, S., Luo, S., Ren, L., Liang, Y., Yang, R., ... & Zhang, D. (2019). Significant impacts of both total amount and availability of heavy metals on the functions and assembly of soil microbial communities in different land use patterns. *Frontiers in microbiology*, 10, 2293. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02293>
- Zheng, X., Zhang, Z., Chen, J., Liang, H., Chen, X., Qin, Y., ... & Gu, M. (2022). Comparative evaluation of in vivo relative bioavailability and in vitro bioaccessibility of arsenic in leafy vegetables and its implication in human exposure assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 126909. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126909>
- Zhou, P., Wang, L., Gao, J., Jiang, Y., Adeel, M., & Hou, D. (2023). Nanoplastic–plant interaction and implications for soil health. *Soil Use and Management*, 39(1), 13-42. <https://doi.org/10.1111/sum.1286>
- Zhou, Y. F., & Haynes, R. J. (2010). Sorption of heavy metals by inorganic and organic components of solid wastes: significance to use of wastes as low-cost adsorbents and immobilizing agents. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(11), 909-977. <https://doi.org/10.1080/10643380802586857>
- Zhu, H., Shen, X., Wang, P., Zheng, L., Hu, S., & Liu, C. (2022). Mechanistic and Modeling Insights into the Immobilization of Cd and Organic Carbon During Abiotic Transformation of Ferrihydrite Induced by Fe(II) (SSRN Scholarly Paper No. 4068199). *Social Science Research Network*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4068199>
- Zhu, Y. X., Zhuang, Y., Sun, X. H., & Du, S. T. (2023). Interactions between cadmium and nutrients and their implications for safe crop production in Cd-contaminated soils. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 53(24), 2071-2091. <https://doi.org/10.1080/10643389.2023.2210985>
- Zhu, Y., Lv, X., Song, J., Li, W., & Wang, H. (2022). Application of cotton straw biochar and compound Bacillus biofertilizer decrease the bioavailability of soil cd through impacting soil bacteria. *Bmc Microbiology*, 22(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02445-w>
- Zine, H., Hakkou, R., Elmansour, A., Elgadi, S., Ouhammou, A., & Benzaazoua, M. (2023). Native plant diversity for ecological reclamation in Moroccan open-pit phosphate mines. *Biodiversity Data Journal*, 11, e104592. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e104592>
- Zou, Q., Zhao, L., Guan, L., Chen, P., Zhao, J., Zhao, Y., Du, Y., & Xie, Y. (2024). The synergistic interaction effect between biochar and plant growth-promoting rhizobacteria on beneficial microbial communities in soil. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1501400>

Références bibliographiques

- Zouari, M., Bloem, E., Souguir, D., Schnug, E., & Hachicha, M. (2023). The nutritional composition of six plant species after irrigation with treated wastewater and possible hazards by heavy metal accumulation. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(43), 97700-97711. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29279-x>
- Zouari, M., Souguir, D., Bloem, E., Schnug, E., Hanchi, B., & Hachicha, M. (2019). Saline soil reclamation by agroforestry species under Kalaât Landelous conditions and irrigation with treated wastewater in Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 28829-28841. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06086>
- Zykova, I., Maksimuk, N., Rebezov, M., Kuznetsova, E., Derkho, M., Sereda, T., ... & Zaitseva, T. (2019). Interaction between heavy metals and microorganisms during wastewater treatment by activated sludge. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 14(11), 2139-4

ANNEXES

ANNEXE 1

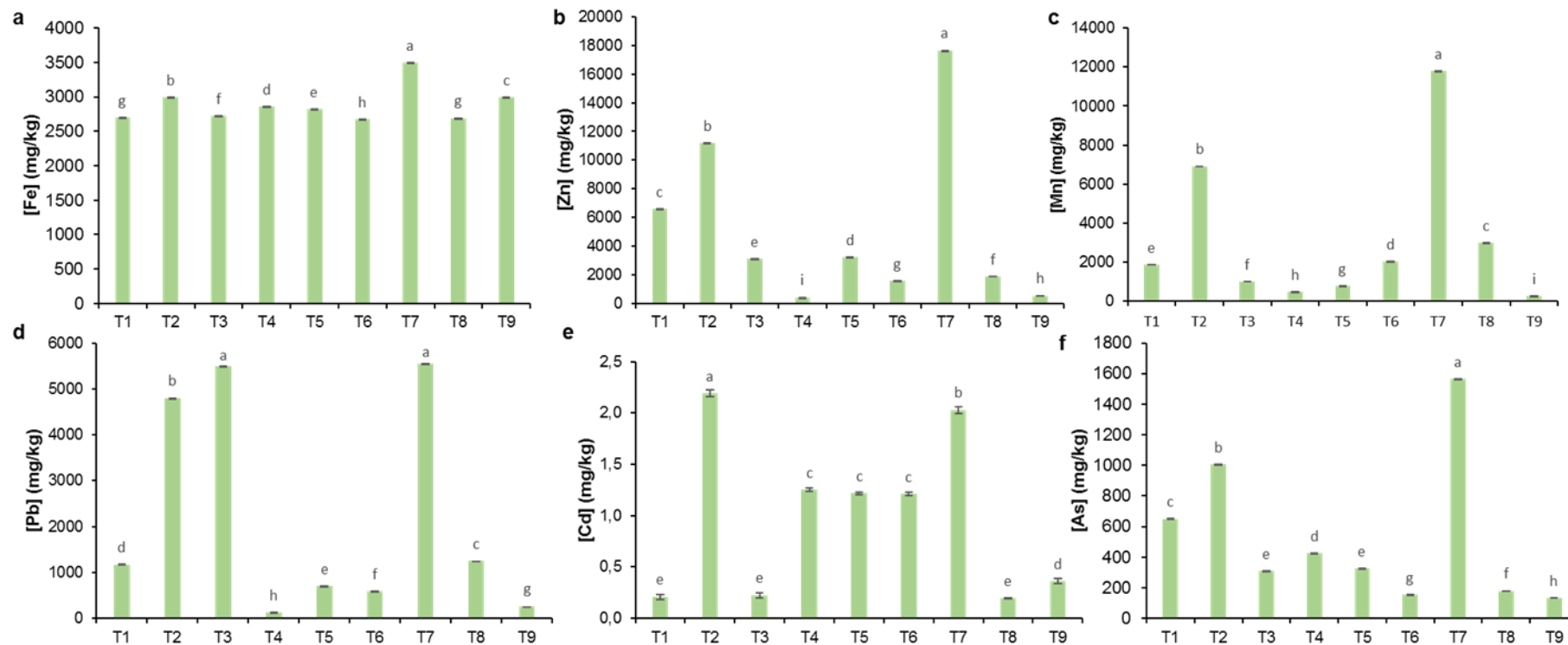


Figure 1. Concentration des métaux et métalloïde par extraction à CaCl_2 (mg/kg de poids sec) des différents échantillons de sol T1, T2 et T3 : en amont de la mine de Tamra, T4, T5 et T6 : au milieu de la mine de Tamra et T7, T8, T9 : en aval de la mine de Tamra : **a)** Fer (Fe), **b)** Zinc (Zn), **c)** Manganèse (Mn), **d)** Plomb (Pb), **e)** Cadmium (Cd) et **f)** Arsenic (As). Les résultats sont exprimés sous forme de valeur moyenne $\pm$ erreur standard ($n = 3$). Les lettres indiquent une différence significative à $p < 0,05$ selon le test LSD.

ANNEXE 2

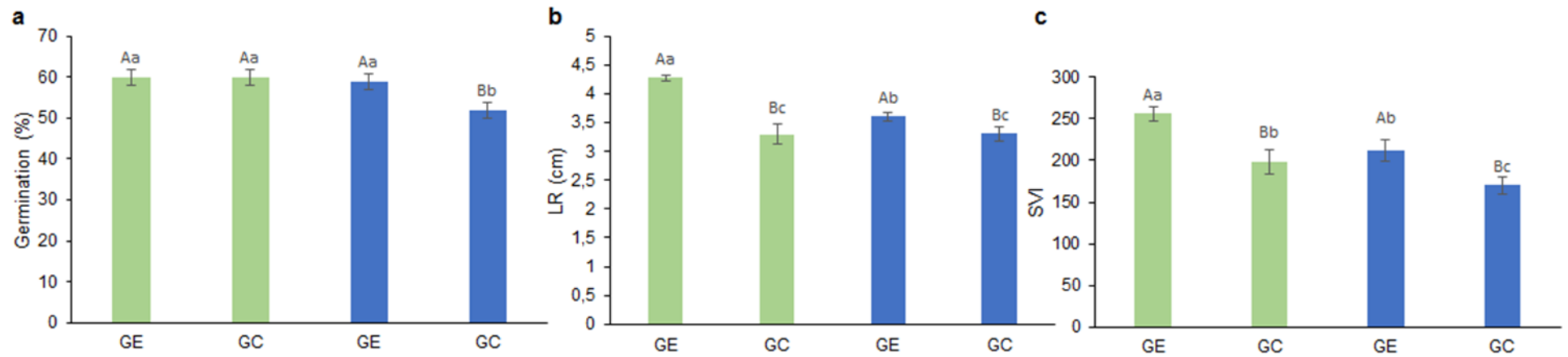


Figure 2. Test préliminaire de germination des graines de *Casuarina glauca* après 36 jours (l'eau distillée en vert et l'extrait du sol minier de Tamra en bleu : **a**) taux de germination (%) ; **b**) longueur des racines (LR ; cm) ; **c**) indice de vigueur des graines (SVI). GE : graines endémiques ; GC : graines commerciales. Valeurs moyennes $\pm$ SE (n = 4). Les lettres majuscules indiquent une différence significative entre les mêmes modalités et les lettres minuscules indiquent une différence significative entre les différentes modalités selon le test LSD ($p < 0,05$).

Oumaima AYADI

Comportement et mobilité des éléments traces métalliques dans des sols environnant la mine de Tamra : contribution à la phytoremédiation par *Casuarina glauca* et rôles de la microflore bactérienne

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude de la réhabilitation des sols contaminés du site minier de Tamra, dernière mine de fer à ciel ouvert encore en activité en Tunisie. L'exploitation prolongée de ce site a entraîné une accumulation significative d'éléments traces métalliques (ETM) - fer (Fe), zinc (Zn), manganèse (Mn), plomb (Pb), cadmium (Cd) et arsenic (As) - à l'origine d'une dégradation marquée des sols, des eaux et des écosystèmes environnants.

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer l'apport du biochar d'*Eucalyptus*, associé à la symbiose actinorhizienne de *Casuarina glauca*-*Frankia* pour atténuer les effets combinés de la toxicité des ETM et du stress hydrique. La première phase de ce travail a porté sur la caractérisation physico-chimique, minéralogique et biologique des sols miniers du site. Les analyses ont révélé une contamination en ETM élevée, une hétérogénéité spatiale marquée et une altération profonde du fonctionnement biologique. Le plomb, le cadmium et l'arsenic d'origine anthropique constituent les polluants dominants, présentant des risques écologiques et sanitaires majeurs. L'étude des activités enzymatiques du sol, indicatrices de la qualité biologique, a révélé un affaiblissement significatif des fonctions microbiennes, une acidité marquée et un déséquilibre des cycles biogéochimiques, témoignant d'un état de dégradation avancé. La distribution verticale des ETM a montré la migration de certains contaminants vers les horizons profonds, révélant un risque réel de transfert vers les nappes phréatiques. L'étude de la flore endémique du site a permis d'identifier plusieurs espèces tolérantes, notamment *Oxalis pes-caprae* et *Myosotis sicula*, capables de s'adapter à la toxicité métallique et présentant un potentiel de phytoremédiation. Parallèlement, l'analyse du réseau hydrique local a confirmé la contamination des eaux de surface et de source en As, Pb et Cd, indiquant des risques sanitaires accrus pour les populations riveraines. Dans un deuxième volet, la faisabilité d'une phytoremédiation assistée par le biochar d'*Eucalyptus*, a été testée sur *Casuarina glauca* cultivée en conditions contrôlées. L'amendement du sol minier contaminé a amélioré significativement la croissance, la photosynthèse et la résilience hydrique des plants tout en réduisant la biodisponibilité du fer et la toxicité globale du substrat. Le biochar a également stimulé le développement des nodules racinaires symbiotiques, véritables puits de métaux, contribuant à leur immobilisation. Enfin, la sélection et la caractérisation de souches bactériennes tolérantes aux ETM, isolées des sols miniers de Tamra, ont conduit à l'identification de *Pseudomonas* sp. comme bio-inoculant prometteur. Combinée à un extrait aqueux de biochar d'*Eucalyptus*, cette souche a stimulé la germination et la vigueur des plantules de *C. glauca*, démontrant l'intérêt d'une approche synergique combinant bio-inoculants et amendements organiques pour la réhabilitation des sols miniers. Les résultats obtenus ont démontré l'efficacité d'une approche intégrée associant *C. glauca*, biochar d'*Eucalyptus* et microflore indigène, comme stratégie de phytoremédiation adaptée aux zones minières dégradées. Cette approche contribue à mieux comprendre les mécanismes de transfert et d'immobilisation des ETM dans les sols miniers et ouvre des perspectives opérationnelles pour la réhabilitation écologique des sites dégradés. Par une démarche multidisciplinaire intégrant écophysiologie, microbiologie et biogéochimie, cette étude apporte une contribution originale à la gestion durable des zones minières contaminées et à la promotion de stratégies de remédiation environnementale efficaces.

Mots clés : Biochar d'*Eucalyptus*, *Casuarina glauca*, Éléments Traces Métalliques, mobilité, site minier, Phytoremédiation

Behavior and mobility of metallic trace elements in soils surrounding the Tamra mine: contribution to phytoremediation by *Casuarina glauca* and roles of bacterial microflora

This thesis is part of a study on the remediation of contaminated soil at the Tamra mining site, Tunisia's last remaining open-pit iron mine. Prolonged exploitation of this open-pit site has led to a significant accumulation of trace metals (TM) such as iron (Fe), zinc (Zn), manganese (Mn), lead (Pb), cadmium (Cd), and arsenic (As)—causing significant degradation of the surrounding soil, water, and ecosystems. The overall objective of this thesis is to evaluate the contribution of *Eucalyptus* biochar, in interaction with the actinorhizian symbiosis of *Casuarina glauca*-*Frankia*, in reducing the combined effects of TME toxicity and water stress. The first phase of this work focused on characterizing the physicochemical, mineralogical, and biological properties of the mining soils at the Tamra site. The analyses revealed high heavy metal contamination, marked by significant spatial heterogeneity and pronounced deep alteration of soil biological functioning. Lead, cadmium, and arsenic of anthropogenic origin appear to be the dominant anthropogenic pollutants, posing major ecological and health risks. The study of soil enzymatic activities, which are indicators of biological quality, revealed a significant weakening of microbial functions, marked acidity, and an imbalance in biogeochemical cycles, indicating a state of severe degradation of the advanced soil ecosystem. Analysis of the vertical distribution of heavy metals showed the migration of certain contaminants to deeper horizons, highlighting a real risk of transfer to groundwater. These observations underscore the need for a targeted remediation strategy that takes into account the most mobile metals and the most impacted areas. At the same time, the study of the site's endemic flora revealed the presence of several tolerant species, notably *Oxalis pes-caprae* and *Myosotis sicula*, capable of adapting to metal toxicity and showing potential for phytoremediation. At the same time, analysis and assessment of the quality of the local water network confirmed the contamination of surface and spring water with As, Pb, and Cd, indicating increased health risks for local populations, particularly through ingestion. In a second phase, this work assessed the feasibility of phytoremediation assisted by eucalyptus-based biochar, which was tested when overapplied to *Casuarina glauca* grown under controlled conditions. Amending the contaminated mining soil with biochar significantly improved plant growth, photosynthesis, and water resilience while reducing iron bioavailability and overall substrate toxicity. At the same time, biochar also stimulated the development of symbiotic root nodules, which act as metal sinks, contributing to the immobilization of heavy metals in the soil. Finally, the selection and characterization of ETM-tolerant bacterial strains isolated from Tamra mining soils led to the identification of *Pseudomonas* sp. as a promising bioinoculant. Combined with an aqueous extract of *Eucalyptus* biochar, this strain significantly improved the germination and vigor of *C. glauca* seedlings, demonstrating the value of a synergistic approach combining bioinoculants and organic amendments for the rehabilitation of mining soils. The results obtained demonstrated the effectiveness of an integrated approach combining *C. glauca*, *Eucalyptus* biochar, and indigenous microflora as a phytoremediation strategy suitable for degraded mining areas. This approach contributes to a better understanding of the mechanisms of transfer and immobilization of heavy metals in mining soils and opens up operational prospects for the ecological rehabilitation of degraded sites. Through the implementation of a multidisciplinary approach integrating ecophysiology, microbiology, and biogeochemistry, this study makes an original contribution to the sustainable management of contaminated mining areas and the promotion of effective environmental remediation strategies for contaminated mining areas.

Keywords : *Eucalyptus*-biochar, *Casuarina glauca*, Metallic trace elements, mobility, mining site, Phytoremediation