



HAL
open science

Les apports des métaux traces par les fertilisants chimiques phosphatés dans les sols libanais : investigation sur leur devenir et leur transfert

Valérie Azzi

► **To cite this version:**

Valérie Azzi. Les apports des métaux traces par les fertilisants chimiques phosphatés dans les sols libanais : investigation sur leur devenir et leur transfert. Géochimie. Université Paul Sabatier - Toulouse III; Université Libanaise, 2016. Français. NNT : 2016TOU30093 . tel-01535848

HAL Id: tel-01535848

<https://theses.hal.science/tel-01535848v1>

Submitted on 9 Jun 2017

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :

Université Libanaise

Présentée et soutenue par :

AZZI Valérie

Le mardi 19 avril 2016

Titre :

Les apports des métaux traces par les fertilisants chimiques phosphatés dans
les sols Libanais: Investigation sur leur devenir et leur transfert

ED SDU2E : Hydrologie, Hydrochimie, Sol, Environnement

Unité de recherche :

UMR 5563 GET-Géosciences Environnement Toulouse

Directeur(s) de Thèse :

LARTIGES Bruno
EL-SAMRANI Antoine

Rapporteurs :

AFRAM Michel
DENAIX Laurence
QUANTIN Cécile

Autre(s) membre(s) du jury :

KOBEISSI Ahmad
MUNOZ Marguerite

A ma très chère famille

Remerciements

Après quatre ans de travail sans arrêt sur les engrais, les laitues et le cadmium je suis arrivée à la fin de cette recherche épuisée mais ravie d'avoir rencontré beaucoup de personnes pendant cette thèse réalisée en cotutelle entre le Liban et la France que je voudrais remercier.

Je voudrais ensuite adresser tous mes remerciements à Monsieur Michel AFRAM, P.D.G. de l'Institut de Recherches Agronomiques Libanais (IRAL) où je suis employée. Merci pour vos aides à faciliter mes démarches administratives à l'IRAL, et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteur. Sans votre aide et accord, je ne pouvais pas continuer ce chemin académique.

Je tiens à exprimer l'expression de ma plus profonde reconnaissance à Monsieur Antoine El SAMRANI qui fût un excellent directeur de thèse Libanais. Merci pour son soutien, sa disponibilité et ses conseils surtout dans les moments difficiles. Un grand merci de m'avoir donné la chance de faire cette thèse et d'avoir cru en mes capacités à arriver jusqu'au bout.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à Monsieur Bruno LARTIGES mon directeur de thèse en France pour son soutien, ses conseils et pour toujours répondre à mes interrogations. Merci pour votre générosité et votre capacité à gérer mon travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur Ahmad KOBEISSI qui a co-encadré ma thèse au Liban et qui a été toujours prêt au soutien scientifique et statistique.

J'exprime ma reconnaissance à Madame Laurence DENAIX et Madame Valérie SAPPIN-DIDIER de l'INRA à Bordeaux pour leurs aides et discussions scientifiques enrichissantes. Aussi, pour leur gentillesse et bonne humeur durant mon premier séjour en France. Merci de m'avoir donnée la chance à apprendre une nouvelle technique scientifique.

Je tiens à remercier Madame Marguerite Munoz pour avoir accepté de juger ce travail.

Je voudrais ensuite adresser mes remerciements à Mesdames Laurence DENAIX et Cécile QUANTIN d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteurs.

Je tiens à remercier Madame Véronique KAZPARD (Université Libanaise) pour m'avoir aidée et conseillée administrativement, scientifiquement et moralement durant ce travail.

J'aimerais aussi remercier mes collègues à l'IRAL: Fadia MONSEF, Zinette MOUSSA, Caroline OJEIL, Abdo TANNOURY et Danny YAMMOUNE.

Je tiens à remercier les cellules techniques du GET et du PRASE pour leurs coopérations au travail expérimental de cette thèse. Un grand merci à Mesdames Sarah HADDAD, Manal

HOUHOU, Sahar RIHAN, Messieurs Mohamed EL HAJJ, Hsein BASSAL et Jonathan PRUNIER.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur Ali KANSO qui m'a aidé au laboratoire et sur le terrain.

Je tiens à remercier mon amie Nour HANNA et qui étaient avec moi durant mon séjour à Toulouse pour leur soutien moral et qui en leur présence je sentais que j'ai une famille en France. Merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble pour changer d'humeur.

Un merci spécial à Fatima YASSINE et Elias MAATOUK qui étaient toujours présents près de moi durant ce long chemin pour me motiver, atténuer le stress et booster le moral.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'INRA-Bordeaux pour m'avoir accueillie durant une durée d'un mois pour la formation sur la technique de DGT.

Mes remerciements vos également aux Mesdames Marie-Claude CATHALA et Zeinab IBRAHIM et toutes les personnes concernées pour leur aide administrative.

Je tiens à remercier également mes collègues et amis de thèse qui sont nombreux, je pense à Rawaa AMMAR, Imen BEJAOUI, Abdel-Amir CHAABAN, Eliane EL-HAYEK, Kamil HAMATY, Georges KACHECHA, Hsein KANBAR, Maha KRAYEM, Sabrina SHOUMAN, Nathalie SLEIMAN.

Je ne peux clôturer ces remerciements sans adresser toute mon affection et ma reconnaissance à ma famille et mes amis d'enfance. Et enfin et surtout tout mon amour à Elie, et mes parents pour leur soutien inconditionnel, leurs encouragements et leur confiance en moi.

A toi PAPA, je dédie ce travail surtout que je n'ai pas pu être présente à tes cotés quand tu avais le plus besoin de moi. J'espère que tu seras toujours en bonne santé et que tu seras surtout fier de moi. C'est surtout grâce à toi, à maman, à mon frère et à ma sœur que j'ai trouvé la force d'affronter tous les obstacles de la vie et d'arriver jusque-là.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
INTRODUCTION	5
I Chapitre I: Synthèse Bibliographique.....	10
I.1 Croissance démographique et agricole	11
I.1.1 Croissance démographique	11
I.1.2 L'introduction des engrais chimiques phosphatés	13
I.2 Les éléments traces métalliques.....	16
I.2.1 Les formations et les distributions des roches phosphates dans le monde	16
I.2.2 Les ETM dans les roches phosphates	18
I.2.3 Les ETM dans le sol	20
I.2.4 Cycle des ETM dans le sol.....	24
I.2.5 Mécanismes de fixation	27
I.2.5.1 L'adsorption et la désorption.....	28
I.2.5.2 La précipitation et la dissolution	29
I.2.5.3 La co-précipitation.....	29
I.2.5.4 La substitution	29
I.2.5.5 L'inclusion.....	29
I.2.6 Influence des paramètres du sol sur la spéciation des ETM	31
I.2.6.1 pH et potentiel redox du sol.....	32
I.2.6.2 CEC et type d'argile	34
I.2.6.3 Abondance des oxydes	36
I.2.6.4 Teneur en matière organique (MO).....	37
I.2.6.5 Les microorganismes	40
I.2.6.6 Compaction et aération du sol	41
I.2.7 Transfert, impact et toxicité des ETM	42
I.2.8 Accumulation dans ETM selon les végétaux.....	44
I.2.9 Fixation racinaire des ETM	45
I.3 Récapitulatif.....	47
I.4 Les sols libanais: Exemple typique de sols basiques sous un climat semi-aride	48
I.4.1 Choix de la plante: <i>Lactuca sativa</i>	50
II Chapitre II: Matériels et Méthodes	53
II.1 Collecte des engrais chimiques phosphatés	54
II.1.1 Procédure de collecte	54
II.1.2 Caractérisation des engrais chimiques phosphatés	55

Table des matières

II.1.3	Méthodes de caractérisation.....	56
II.1.3.1	Diffraction des rayons X (DRX)	56
II.1.3.2	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR).....	57
II.1.3.3	Spectrométrie de fluorescence X (FRX)	58
II.1.3.4	pH et conductivité.....	59
II.1.3.5	Chromatographie ionique et photométrie à flamme	59
II.1.3.6	Spectrométrie d’Absorption Atomique (SAA).....	60
II.2	Migration des métaux dans le sol.....	62
II.2.1	Concept des colonnes.....	64
II.2.2	Préparation du sol de remplissage des colonnes	65
II.2.3	Choix de l’engrais chimique phosphaté et du contaminant métallique	66
II.2.4	Plan de l’expérience	67
II.2.5	Suivi expérimental des colonnes de sol	69
II.2.6	Méthodes de caractérisation.....	73
II.2.6.1	pH et conductivité.....	74
II.2.6.2	Capacité d’échange cationique (CEC).....	74
II.2.6.3	Teneur en Matière Organique (MO).....	75
II.2.6.4	Calcaire Total (C.T.).....	76
II.2.6.5	Texture.....	77
II.2.6.6	Analyse des métaux traces (SAA)	79
II.2.6.7	Détermination de la population microbienne	80
II.2.6.7.1	Enumération des bactéries totaux	81
II.2.6.7.2	Enumération des champignons	81
II.2.6.7.3	Enumération des bactéries résistantes au Cadmium.....	81
II.2.6.7.4	Enumération des microorganismes solubilisant le phosphate (MSP) ...	82
II.2.6.8	Détermination des activités enzymatiques	82
II.2.6.8.1	Phosphatases (acide et alcaline)	82
II.2.6.8.2	Déshydrogénase.....	83
II.2.6.9	Caractérisation des laitues	83
II.2.6.9.1	Activité de la Nitrate Réductase (ANR)	84
II.2.6.9.2	Contenu en chlorophylle.....	84
II.2.6.9.3	Surface foliaire	85
II.2.6.9.4	Eléments traces métalliques dans les plantes	85
II.2.6.10	Caractérisation de l’eau infiltrée.....	85
II.2.6.11	Caractérisation du sol de la carotte prélevée	86
II.2.6.11.1	Granulométrie.....	86

Table des matières

II.2.6.11.2	Le Potentiel Zeta.....	86
II.3	Culture des laitues en milieu hydroponique.....	88
II.3.1	Préparation et conditionnement du système	89
II.3.2	Traitements du système hydroponique	90
II.3.3	Caractérisation du système hydroponique	91
III	Chapitre III: Résultats et Discussion.....	93
	Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries	96
1	Introduction.....	97
2	Experimental	98
2.1	Fertilizer materials	98
2.2	Gross characterization of fertilizer samples.....	101
2.3	Nature of heavy metal bearing phases	101
2.4	Quantitative assessment of heavy metal contaminants.....	101
2.5	Statistical analysis.....	102
3	Results and discussion	102
3.1	Mineral phases and functional groups	102
3.2	Geochemical characteristics of fertilizers.....	106
3.3	Input of trace metals in agriculture soils.....	116
4	Conclusions.....	117
	<i>Lactuca sativa</i> growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination.....	126
1.	Introduction.....	127
2.	Experimental section.....	128
2.1	Soil sampling	128
2.2	Experiment design	129
2.3	Plant growth and sample preparation.....	130
2.4	Total chlorophyll content.....	131
2.5	Nitrate reductase activity (NRA)	131
2.6	Heavy metals in soil layers and leachate water samples.....	131
2.7	Accumulation, translocation and bioaccumulation of heavy metals	131
2.8	Statistical analyses	132
3.	Results and Discussion	132
3.1	Crop growth	132
3.1.1	Leaf growth.....	132
3.1.2	Root development	133
3.1.3	Plant height	135

Table des matières

3.1.4 Dry mass of shoots and roots	135
3.1.5 Chlorophyll content	136
3.1.6 Nitrate Reductase Activity.....	137
3.2 Cd distribution along the soil columns	138
3.3 Leachates composition.....	139
3.4 Cd transfer to lettuce	141
4 Conclusions.....	144
Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer.....	157
1. Introduction.....	158
2. Materials and methods	160
2.1 Sampling site.....	160
2.2 Experimental design.....	161
2.3 Biochemical analyses.....	162
2.3.1 Microbial population.....	162
2.3.2 Enzyme activities measurements	163
3. Results and discussion	164
3.1 Soil Characteristics	164
3.2 Cadmium behavior in soil profile	165
3.3 Microbial population in soil profile.....	168
3.4 Enzyme activities	176
4. Conclusions.....	184
Effect of cadmium on <i>Lactuca sativa</i> grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer.....	194
1. Introduction.....	195
2. Experimental Section.....	196
2.1. Hydroponic support cylinders.....	196
2.2 <i>Lactuca sativa</i> plants and growth conditions	197
3. Results and Discussion	199
3.1. Aerial part of <i>Lactuca sativa</i> grown under Cadmium treatments	199
3.2. Root part of <i>Lactuca sativa</i> grown under Cadmium treatments	203
3.3. Cadmium transfer to <i>Lactuca sativa</i>	204
4. Conclusion	206
Spéciation du Cadmium dans la culture hydroponique de <i>Lactuca sativa</i>	211
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	214
RÉFÉRENCES	218

Table des matières

Annexes.....	234
--------------	-----

Liste des figures

Figure 1 Personnes sous-alimentées en 2001-2003 (en millions) (FAO 2006a).	11
Figure 2 Augmentation de a) la superficie des terres cultivées en Egypte et b) la production de maïs au Ghana (FAO 2006b).	13
Figure 3 Taux de production mondiale de phosphate depuis 1850 (Abouzeid 2008).	14
Figure 4 Distribution des roches phosphatées dans le monde et les principaux gisements exploités et quelques gisements connus mais non exploités (Abouzeid 2008).	17
Figure 5 a) Cycle des métaux dans le sol (Denaix 2007) et b) Dynamique des métaux dans le système sol-plante (Fernandez-Cornudet 2006).	26
Figure 6 Principales interactions entre un atome et un solide à l'interface solide/liquide: a) adsorption d'un ion via la formation d'un complexe de sphère externe; b) perte de l'eau d'hydratation et formation d'un complexe de sphère interne; c) diffusion et substitution isomorphique à l'intérieur du minéral; d) diffusion rapide latérale et formation d'un polymère de surface; e) adsorption sur un rebord qui optimise le nombre de liaisons à l'atome; f) durant la croissance de particule, les polymères de surface s'intègrent dans la structure; g) l'ion adsorbé peut retourner en solution, soit par l'équilibre dynamique, soit par des réactions rédox de surface. Petite figure à droite montre l'incorporation des ions métalliques dans l'espace interfeuillaire de l'argile (Sparks 2005).	27
Figure 7 Modes de sorption des cations sur la surface de montmorillonite (Sposito 2008).	28
Figure 8 Localisation théorique des métaux dans les différentes phases du sol (Denaix 2007).	31
Figure 9 Localisation et mobilité des ETM dans le sol (Sirven 2006).	32
Figure 10 Concentrations des ETM dans la solution de sol dans un sol sableux podzolique gleyique (Kabata-Pendias 2011).	33
Figure 11 a) Schématisation des couches tétraédriques et octaédriques, b) Structure d'un feuillet de kaolinite et c) Structure d'un feuillet de montmorillonite.	36
Figure 12 Adsorption des ETM sur la goéthite avec les pK_a de chaque ETM entre parenthèse: Pb (7,7), Cu (8), Zn (9), Co (9,7), Ni (9,9) et Mn (10,6) (utilisée par Basta et al. 2005).	37
Figure 13 Complexation ETM et matière organique naturelle (Senesi 1992).	38
Figure 14 Effet du pH sur la sorption des ETM sur l'acide humique (Kabata-Pendias 1993).	39
Figure 15 Pouvoir de fixer les ETM par la MO, l'argile et les oxydes/hydroxydes (Kabata-Pendias 2011).	39
Figure 16 Démarche expérimentale pour la caractérisation des engrais phosphatés	56
Figure 17 Représentation schématique de la fluorescence X.	58
Figure 18 Site d'échantillonnage d'Ammik: a) Localisation du site; b) photo aérienne (source Google Earth) du sol S1 et S2.	63

Liste des figures

Figure 19 Système des colonnes de migration.....	65
Figure 20 Remplissage des colonnes de sol.....	66
Figure 21 Représentation schématique de la distribution aléatoire des colonnes de migration.	68
Figure 22 Plantules de laitues après 10 jours de culture.....	68
Figure 23 Culture des laitues dans une chambre conditionnée au 65 ^{ème} jour de culture.	69
Figure 24 Test de germination.	70
Figure 25 Procédure de caractérisation du sol S1 et celle après 77 jours de culture.	71
Figure 26 Démarche expérimentale de caractérisation: a) des laitues cultivées et b) de l'eau infiltrée des colonnes de migration.	72
Figure 27 Caractérisation des strates du sol S2.	73
Figure 28 Diagramme de texture du sol (USDA).	79
Figure 29 a) Les différentes strates de sol et b) la rhizosphère.....	80
Figure 30 Représentation schématique: a) des dilutions effectuées b) de l'inoculation sur les milieux de culture.	80
Figure 31 Préparation des réservoirs.....	89
Figure 32 Caractérisations des laitues en culture hydroponique.	91
Figure 33 Quantités en µg de Cd, Zn et Pb par masse totale de partie aérienne et de racines exprimée en g dans les différents traitements.	154
Figure 34 Concentrations de Zn et Pb dans l'eau infiltrée dans les différents traitements....	155
Figure 35 Formes du cadmium dans les milieux en absence de P.....	211
Figure 36 Formes du cadmium dans les milieux en présence de P (123,34 mg P ₂ O ₅ /L).	212
Figure 37 Formes du cadmium dans les milieux en présence de P (585 mg P ₂ O ₅ /L).	212

Liste des tableaux

Tableau 1 Projection concernant la sous-alimentation dans les pays en développement (FAO 2006a).	12
Tableau 2 Production mondiale de phosphate et réserves.	15
Tableau 3 Teneur moyenne des ETM dans la croûte terrestre.....	16
Tableau 4 Les concentrations d'ETM dans les roches d'origines magmatiques et sédimentaires (Redon 2009).	19
Tableau 5 Teneur en ETM dans les roches phosphatées (RP) de quelques pays (Javied et al. 2009, Mar and Okazaki 2012).	19
Tableau 6 Moyenne des ETM ajoutés aux sols par les dépôts atmosphériques et les engrais utilisés.	21
Tableau 7 Teneurs maximales des ETM dans les sols.....	21
Tableau 8 Teneur des ETM dans les fertilisants phosphatés (Kabata-Pendias 2011).	22
Tableau 9 Estimation de la quantité d'ETM ajoutée aux sols suite à la fertilisation phosphatée.....	23
Tableau 10 Série d'affinité empirique des ETM pour les constituants du sol (Fernandez-Cornudet 2006).	30
Tableau 11 Propriétés et compositions des minéraux argileux (Giroud and Boterro 1972, Kabata-Pendias 2011).	34
Tableau 12 Temps de résidence de quelques ETM dans les sols sous un climat tempéré (Kabata-Pendias 2011).	43
Tableau 13 Facteur de transfert de quelques ETM dans différentes espèces végétales.....	47
Tableau 14 Terres utilisées ou exploitées en agriculture (Asmar 2011).	50
Tableau 15 Caractéristiques rapportés par les producteurs des 44 engrais échantillons collectés.....	54
Tableau 16 Caractéristiques du superphosphate simple utilisé.....	66
Tableau 17 Les différents traitements effectués sur la solution de Hoagland.	90

Résumé

L'utilisation de machines lourdes et la fertilisation des sols ont été la solution pour améliorer le rendement agricole et augmenter les aires des sols cultivés. Les pays émergents Est-Méditerranéens souffrent d'un manque crucial des législations et des réglementations qui organisent l'usage des fertilisants chimiques. Cela est principalement dû à l'insuffisance des données sur les caractéristiques des sols et les pratiques agricoles. La fertilisation excessive est devenue une source potentielle de contamination des sols par les éléments traces métalliques (ETM) susceptible de migrer vers les différentes chaînes alimentaires. Dans ce cadre, l'Institut de Recherches Agronomiques Libanais (IRAL) avait comme préoccupation principale d'évaluer les risques associés aux apports en ETM issus des engrais phosphatés en usage dans des sols de nature alcaline sous un climat aride à semi-aride.

Ainsi, l'investigation sur les engrais phosphatés commercialisés au Liban et les pays voisins ont montré que le cadmium est porté principalement dans une phase sulfate quand cette dernière est présente dans les engrais. L'apport moyen annuel du Cd, Cu, Pb et Zn aux sols est trouvé inférieur aux limites recommandées dans certains pays comme le Brésil et la Grande-Bretagne. Cependant, dans le contexte régional où l'étude est réalisée, cet apport est relativement élevé quand la nature alcaline du sol est prise en considération. Ainsi, une norme établie pour un sol acide n'est pas nécessairement adaptable dans un sol alcalin, sachant que ce dernier est un milieu favorable pour stabiliser les ETM et limiter leurs disponibilités. Les *Lactuca sativa* (laitues), étant une espèce amplement consommée dans les pays du bassin méditerranéen, ont été choisis comme une espèce cible dans l'objectif de suivre la distribution du cadmium dans les différents tissus de l'espèce et le coefficient de partage entre les compartiments eau, sol et plante. Les effets de la densité des sols, en présence du cadmium et des engrais phosphatés ont été étudiés dans des colonnes de sols cultivés par les laitues. Les caractères morphologiques et physiologiques de la plante, la mobilité du cadmium dans le sol et son transfert vers les laitues, la population microbienne (le nombre de bactéries totaux, champignons totaux, bactéries résistantes au cadmium BRC et micro-organismes solubilisant le phosphore MSP) et l'activité enzymatique des phosphatases alcalines (ALP) et acides et les déshydrogénases (DHA) ont été suivis. La présence du Cd et du phosphore dans le sol a diminué la mobilité du cadmium et la compaction a augmenté l'accumulation du Cd dans la partie aérienne des laitues et l'infiltration des nitrates. La combinaison entre la compaction du sol, la présence de cadmium et du phosphore en même temps a montré une diminution du nombre de bactéries, des champignons

totaux et de l'activité d'ALP mais une augmentation du nombre de MSP, de BRC et de l'activité de la phosphatase acide est notablement identifiable.

En absence de toute matrice d'interaction avec les ETM et les fertilisants phosphatés autre que les laitues, les effets du cadmium et de l'engrais phosphatés ont été évalués sur les caractères morphologiques et physiologiques des laitues en culture hydroponique et sur l'absorption du cadmium par ces laitues. En présence d'engrais phosphaté, la culture des laitues en hydroponie avait une influence positive sur le développement de ce végétal plus qu'en culture dans le sol. Malgré la croissance rapide des laitues en hydroponie, ce système est désormais une source de cadmium disponible aux laitues puisque ce métal est transféré des racines vers la partie aérienne de *Lactuca sativa* en induisant des changements morphologiques.

Mots-clés

Cadmium, engrais phosphatés, enzymes, ETM, hydroponie, *Lactuca sativa*, sol alcalin, transfert.

Abstract

Soil compaction and contamination with heavy metals were the response of the use of heavy machinery and phosphate fertilization to improve and expand agricultural productivity. The Eastern Mediterranean emerging countries suffer from lack in legislations and regulations organizing the chemical fertilizers use. This is due to the insufficient data on soil characteristics and agricultural practices. Thus, excessive fertilization can be considered as potential sources of soil contamination by trace metals susceptible to be transferred to the different food chains. One of the main occupations of the Lebanese Agriculture Research Institute (LARI) was to evaluate the associated risks to the trace metals inputs coming from phosphate fertilizers.

The investigation of phosphate fertilizers used in Lebanon and neighboring countries showed that cadmium is well bonded to sulfate-phase when sulfate is present in the fertilizers. The annual average of the deposition of Cd, Cu, Pb and Zn in soil was found lower than the recommended limits in some countries like Brazil and Britain but such contribution is relatively high when considering the alkaline nature of the soil. Thus, norms and legislations for acidic soil cannot be necessarily adaptable and used for alkaline soil knowing that such soil is the best environment to stabilize the metals and limit their bioavailability. *Lactuca sativa* (lettuce), widely consumed specie in Mediterranean countries, has been chosen as target specie to be studied in order to follow cadmium in different parts of the plants and its partition between water, soil and plants. The effects of the compaction, cadmium and phosphate fertilizers were evaluated on morphological and physiological characteristics of *Lactuca sativa* cultivated in columns. Cadmium mobility in soil and its transfer to lettuce, the microbial population (the number of total bacteria, total fungi, cadmium resistant bacteria CRB and phosphate solubilizing microorganisms PSM) and the enzymatic activities of alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase and dehydrogenase activity (DHA) were also studied. Cadmium mobility was decreased in the soil amended with cadmium and phosphorus and compaction increased the Cd accumulation in the lettuce's aerial part and the nitrate infiltration. A decrease of the number of total bacteria, fungi, ALP and an increase in the number of PSM, CRB and acid phosphatase activity were observed in the treatment where the soil was compacted and amended with cadmium and phosphate fertilizers.

In absence of any interactive matrix with the metals and the phosphate fertilizers other than the lettuces, the effects of cadmium and phosphate fertilizer were evaluated on morphological and physiological characteristics of lettuces grown in hydroponic culture. Cadmium absorption and

transfer to aerial part was also studied. The lettuces development's was important in the hydroponic culture more than in soil cultivation in presence of phosphate fertilizer. Despite the rapid growth of lettuces in hydroponic culture, this system is a potential source of bioavailable cadmium that is absorbed by lettuces and transferred to roots and aerial parts conducting to morphological changes.

Keywords

Alkaline soil, cadmium, enzymes, hydroponic culture, *Lactuca sativa*, phosphate fertilizers, trace metals, transfert.

INTRODUCTION

Introduction

Durant les dernières décennies, l'utilisation des engrais chimiques phosphatés est devenue l'une des solutions inévitables pour apporter les nutriments nécessaires aux plantes, augmenter la production agricole, améliorer la qualité des cultures et étendre les espaces agricoles vers des sols considérés comme peu productifs et non fertiles (Chen S. et al. 2006, FAO and IFA 2000). Otero et al. (2005) évaluent la consommation mondiale en nutriments à 135 million de tonnes alors que dans les pays du Moyen-Orient, cette consommation en engrais n'excédait pas les 6 million de tonnes en 2002. D'après les données du FAO (Food and Agriculture Organisation), l'ESCWA (United Nations Economic and Social Commission for Western Asia) et Farajalla (2010), le Liban consomme 1860 Kg d'engrais/ha/an, les Emirates (1166 Kg/ha/an), l'Égypte (906 Kg/ha/an) et le Sultanat d'Oman (644 Kg/ha/an) (Bashour 2008).

Certainement la fertilisation a des effets positifs sur la croissance des plantes et le développement racinaire pour tirer les nutriments du sol, mais engendre aussi plusieurs problèmes. Tout d'abord, les engrais chimiques phosphatés sont connus comme étant une source de polluants métalliques et radioactifs provenant principalement de la roche mère phosphatée (Nziguheba and Smolders 2008, Yamaguchi et al. 2009). Un lessivage de 60% du phosphore provenant des engrais peut entraîner une eutrophisation des eaux de surface et une prolifération algale et des macrophytes provoquant ainsi la diminution de l'oxygène dans l'eau et la mort de la vie aquatique (Giuffré et al. 1997, Djovic et al. 2004, Van Vuuren et al. 2010).

Les polluants comme les éléments traces métalliques (ETM) (l'arsenic As, le cadmium Cd, le zinc Zn, le fer Fe, le plomb Pb), les éléments rares tels que le lanthane La, le cérium Ce, l'euporium Eu, l'ytterbium Yb, le samarium Sm et les éléments radioactifs naturels tels que l'uranium U, le thorium Th, le potassium K et le radium Ra retrouvés dans les engrais chimiques, sont accumulés dans les sols suite à la fertilisation, l'irrigation et l'application de plusieurs variétés des pesticides (Abdel-haleem et al. 2001, Chen W. et al. 2007, Gupta et al. 2014, Ogunleye et al. 2002).

Les ETM peuvent persister dans le sol ou seront disponibles, absorbés par les plantes particulièrement dans les sols acides et transférés à la chaîne alimentaire. Ainsi, l'alimentation constitue un vecteur principal d'exposition de l'homme aux ETM (Giuffré et al. 1997, Taylor 1997, McLaughlin et al. 1999, Tu et al. 2000).

L'absorption des ETM par les plantes dépend de leur concentration dans la solution du sol et de leurs formes physico-chimiques, i.e. leur spéciation, biodisponibilité et mobilité dans le sol (Song et al. 1999, Tan et al. 2000, Sipos et al. 2008).

Normalement, la plupart des pays suivent les normes européennes ou celles du Codex Alimentarius qui ont pour but de protéger la santé des consommateurs et assurer les bonnes pratiques dans l'industrie agroalimentaire (Bashour 2008). L'Union Européenne et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ont aussi élaboré des normes concernant les concentrations des ETM dans le sol et dans l'eau potable (Chen G.C. et al. 2006). Plus particulièrement, l'ACIA (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments) et l'U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency) ont défini les limites de tolérance de certains ETM dans les engrais chimiques. Bien que ces normes ne soient pas élaborées dans toute l'Europe, quelques pays comme l'Autriche, la Finlande et le Suède ont fixé une limite pour la concentration du cadmium dans les engrais chimiques (Otero et al. 2005).

Bien que le Liban soit un membre de la Commission du Codex Alimentarius, ce pays n'a effectué que peu d'études sur les quantités d'ETM présents dans les engrais chimiques, les végétaux, les fruits et les grains. Ainsi, il existe une absence de compréhension du cycle engrais-sol-plantes-homme et une absence de loi ou de réglementation qui assure le cadre juridique de la sécurité alimentaire. Le pays endure continuellement des problèmes au niveau de l'exportation de sa propre production en légumes, grains et même en engrais chimiques. Les laboratoires responsables de la qualité des engrais importés ou exportés sont dépendants du ministère de l'Agriculture Libanais comme l'Institut de Recherches Agronomiques Libanais (IRAL). L'institut mène la recherche appliquée et fondamentale pour le développement et la promotion du secteur agricole au Liban. Des analyses sur la qualité des sols, de l'eau et des engrais sont assurées et même les niveaux de produits phytosanitaires de types pesticides employés et des quantités des ETM dans les engrais mentionnés sur les fiches du producteur sont aussi évaluées. Dans les analyses demandées par le gouvernement pour l'importation d'engrais, seuls les macroéléments présents sur la feuille de production d'engrais sont à analyser dans les tests de routine à ce jour. Il en résulte un manque de données sur la qualité des engrais dans le pays et la quantité des ETM présents puisqu'il n'y a pas de lois qui obligent les importateurs, exportateurs ou même les producteurs d'engrais à faire une caractérisation détaillée de l'engrais.

Au niveau mondial, de nombreuses études ont été menées sur la quantité d'ETM ajoutée par les engrais chimiques phosphatés sur des sols acides sous un climat humide et sur leur mobilité dans le sol et leur transfert aux plantes (Camobreco et al. 1996, François et al. 2009, Grant et al. 2010, Sayyad et al. 2010). Cependant, le comportement des ETM apportés par les engrais n'est pas bien connu dans les sols arides- à semi-arides et dans les sols basiques.

Cette thèse a deux objectifs principaux:

Le premier objectif est à une échelle nationale et régionale qui consiste à suivre le comportement des ETM dans les sols basiques sous un climat aride à semi-aride caractéristique des sols des pays du Moyen-Orient et leurs effets sur le développement des plantes dans un tel environnement.

Le deuxième objectif d'intérêt national cherche à identifier les apports en ETM par les engrais chimiques phosphatés pour en déterminer l'apport annuel aux sols libanais. Cette étude permet d'apporter des bilans quantitatifs et qualitatifs au cadre législatif et faciliter les réglementations à ce niveau dans un cadre national tenant en considération les particularités climatiques et pédologiques du pays.

Ce manuscrit se compose en trois grandes parties:

- Le premier chapitre est une synthèse bibliographique dans laquelle nous parlerons de la sécurité alimentaire et le manque de lois et de réglementations. Ensuite on abordera la problématique liée aux interactions dans le système sol-ETM et à l'accumulation des ETM dans les plantes et leur transfert. Dans la dernière partie de ce chapitre, nous ferons l'état de l'art sur le comportement des ETM dans le sol, et plus particulièrement on fera une synthèse des données disponibles dans le contexte libanais.

- Le deuxième chapitre détaille l'approche méthodologique et expérimentale suivie dans la thèse pour étudier les engrais chimiques phosphatés utilisés sur le marché libanais, faire leur caractérisation chimique, minérale et structurale. Après avoir choisi l'engrais phosphaté le plus contaminé en ETM, l'effet de ces métaux sur la croissance de laitues dans un modèle de colonnes de migration de sol à différentes compactions, la migration des métaux dans les strates du sol et enfin leur transfert vers les laitues seront étudiés. Finalement, nous allons exposer la démarche utilisée pour comprendre le transfert des métaux dans une culture hydroponique en absence de matrice de sorption des engrais et des métaux traces.

- Le troisième et dernier chapitre décrit l'ensemble des résultats et est réparti en quatre parties. Quatre parties présentent les principales données et résultats obtenus sous forme de 4 articles.

Le premier article 'Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries' donne la caractérisation des engrais chimiques phosphatés, la relation entre la composition chimique et minéralogique de ces engrais et la teneur en ETM afin d'obtenir une analyse prédictive sur la quantité d'ETM ajoutée dans les sols Libanais suite à la fertilisation.

Le deuxième article '*Lactuca sativa* growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination' traite de la problématique de la migration et du transfert du cadmium dans les différents profils de sol contaminé et les laitues plantées dans ces sols.

Le troisième article 'Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer' étudie l'effet de la compaction du sol, de la présence du cadmium et de la fertilisation phosphatée sur le développement microbien et l'activité enzymatique de trois enzymes de sol.

Le quatrième article 'Effect of cadmium on *Lactuca sativa* growth in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer' étudie les effets du cadmium sur la croissance des laitues cultivées dans une culture hydroponique et la partition des ETM dans *Lactuca sativa*.

- La thèse se termine par une synthèse de l'ensemble des principaux résultats obtenus et propose les perspectives qui sont tirées de la thèse.

I Chapitre I: Synthèse Bibliographique

I.1 Croissance démographique et agricole

I.1.1 Croissance démographique

La population mondiale a augmenté depuis 1950 de 2,5 milliards à 6,1 milliards en 2000. Ce nombre deviendra 9,1 milliards en 2050 ce qui veut dire un dédoublement de la population mondiale en 50 ans (Gilland 2002, Carvalho 2006). Selon les estimations de la FAO, le nombre de personnes sous-alimentés était en 2001-2003, 854 millions dans le monde, dont 820 millions dans les pays en développement, 25 millions dans les pays en transition et 9 millions dans les pays industrialisés. L'Inde a le plus grand nombre de personnes sous-alimentées, soit 212 millions de personnes, malgré une croissance relativement importante des revenus de 3,9% par an entre les années 1990 et 2003 (**Figure 1**). En général, la prévalence de la faim dans les pays en développement devrait diminuer de moitié en 2015 par rapport à la période de base (1990-1992) mais cette diminution ne touchera pas toutes les régions. En effet, en Afrique subsaharienne, au Proche-Orient et en Afrique du Nord, on est face à une augmentation du nombre de personnes sous-alimentées en 2015 (**Tableau 1**) (FAO 2006a).

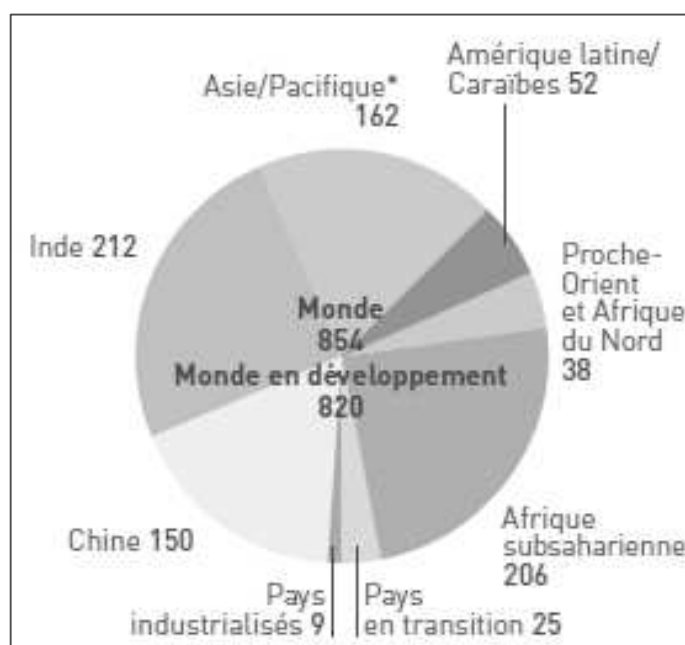


Figure 1 Personnes sous-alimentées en 2001-2003 (en millions) (FAO 2006a).

Tableau 1 Projection concernant la sous-alimentation dans les pays en développement (FAO 2006a).

	Nombre de personnes sous-alimentées (millions)		Prévalence de la sous-alimentation (% de la population)	
	1990-1992*	2015	1990-1992*	2015
Pays en développement	823	582	20,3	10,1
Afrique subsaharienne	170	179	35,7	21,1
Proche-Orient et Afrique du Nord	24	36	7,6	7
Amérique Latine et Caraïbes	60	41	13,4	6,6
Asie du Sud	291	203	25,9	12,1
Asie de l'Est**	277	123	16,5	5,8

Notes: La période de base pour les projections est 1999-2001 et non pas 2001-2003, dernières années pour lesquelles des chiffres relatifs à la sous-alimentation sont présentés dans ce rapport. Plusieurs petits pays ont également été exclus des projections.
* Les données pour 1990-1992 peuvent différer légèrement des chiffres indiqués ailleurs dans le rapport, dans la mesure où les projections reposent sur des estimations de la sous-alimentation qui n'incluent pas les dernières révisions.
** Y compris l'Asie du Sud-Est.

Dans la région du Proche-Orient et de l'Afrique du Nord, à l'exception de l'Afghanistan et de l'Iraq où les données sont rares, seule la population du Yémen a augmenté de 4,2 millions à 7,1 de 1991-1993 à 2000-2003 et plus d'un-tiers de la population est sous-alimenté. Après le Yémen, la population affamée a augmenté de 100 000 à 400 000 personnes en Jordanie et la prévalence de la sous-alimentation a augmenté de 4 à 7% de la population. Tout cela est dû aux fautes de ressources, en particulier d'eau et des importations alimentaires puisque seulement 10% de la population travaillent en agriculture et la performance de l'économie jordanienne est liée aux fluctuations des prix du pétrole. Dans les autres pays comme le Kuweit, les Emirats Arabes Unis, la Syrie, l'Egypte et le Liban, on a observé une diminution du nombre de personnes sous-alimentées qui est devenu inférieur à 5%. Cette diminution de la famine est causée par une augmentation de la production agricole puisque 43% de la population globale vit en zone rurale où l'agriculture est considérée comme le moteur de l'économie (Carvalho 2006, FAO 2006a). En plus, dans les pays qui souffrent de sécheresse, l'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'eau et des pratiques de gestion était la réponse décisive pour l'amélioration des rendements agricoles et la diminution de l'aggravation de la pénurie en eau (FAO 2006a). La FAO a encouragé l'agriculture à produire plus de nourriture et à assurer la sécurité alimentaire pour diminuer le nombre de personnes sous-alimentées voire diminuer la famine et améliorer la santé ce qui est un objectif primordial pour l'OMS.

Afin d'augmenter la production agricole, les pays ont exploité des terres peu productives en utilisant les engrais chimiques, les pesticides, les insecticides et les plantes résistantes aux maladies et aux insectes ou même les plantes génétiquement modifiées (Alexandratos 1999, Gilland 2002). Notons une augmentation de la superficie des terres cultivées, en Egypte, de 4,7 millions à 6,5 millions ha entre 1982 et 2003 (**Figure 2a**) et une augmentation de la production du maïs de 83% au Ghana entre les années 1961 et 2003 (**Figure 2b**).

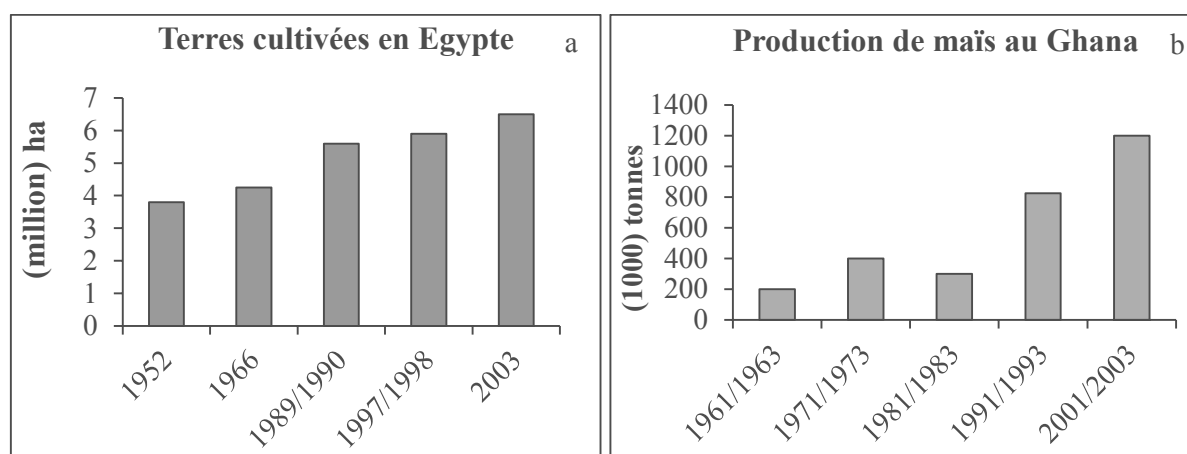


Figure 2 Augmentation de a) la superficie des terres cultivées en Egypte et b) la production de maïs au Ghana (FAO 2006b).

En plus, les dépenses publiques agricoles ont augmenté de 40 à 75% depuis 1975 à 2002 en Inde, tandis qu'en Zambie, 37% du budget agricole était dépensé pour octroyer les subventions aux engrais en 2005 (FAO 2012). Mais la superficie des sols arables est en diminution puisque le taux de population a augmenté et il y a des problèmes relatifs à l'érosion, la salinisation du sol, la diminution de la fertilité des sols, la désertification des sols et la diminution des ressources en eau.

I.1.2 L'introduction des engrais chimiques phosphatés

Le besoin d'augmenter la production alimentaire mondiale, implique la croissance à long-terme de la demande de l'exploration et de l'exploitation des roches phosphatées (Sis and Chander 2003). Le phosphore, élément essentiel aux plantes, stimule la croissance et le développement racinaire, la longueur de la tige, la résistance aux maladies, la fixation de l'azote dans les légumes... Dans la nature, il se trouve 1) sous forme minérale issu de la roche mère phosphatée ou de l'apatite, 2) organique comme dans les phospholipides, acides nucléiques, protéines dans les déchets des animaux, les résidus des plantes, 3) inorganique dissout

(univalent, trivalent ou pentavalent) 4) gazeux lors de l'oxydation et 5) particulaire ou colloïdale (Aydin et al. 2009).

La production d'engrais chimique phosphaté a augmenté mondialement depuis 1850 pour atteindre 148 millions de tonnes en 2005 dont 143 millions de tonnes sont produits par 16 pays seulement (**Figure 3**) (Abouzeid 2008).

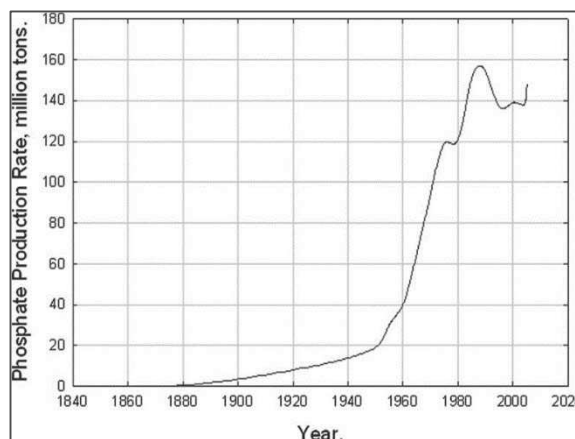


Figure 3 Taux de production mondial de phosphate depuis 1850 (Abouzeid 2008).

Sur le marché, les engrais phosphatés les plus communs, contenant N, P et K sont le triple superphosphate (TSP), le superphosphate simple (SSP), le phosphate monoammoniacal (MAP) et le phosphate diammonique (DAP).

La production de ces engrais consiste en l'acidification de la roche mère phosphatée, connue par l'apatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 [\text{F}, \text{OH} \text{ ou } \text{Cl}]$), de façon à rendre le phosphore plus soluble (Knox et al. 2006) et 95% des roches phosphatées sont utilisés pour cette production d'engrais (Abouzeid 2008, Aydin et al. 2009).

L'acidification de la roche mère phosphatée par l'acide sulfurique va engendrer la production d'acide phosphorique et de phosphogypse qui est une impureté sous forme de sulfate de calcium selon la réaction (Roselli et al. 2009, Al-Hwaiti et al. 2010, Chauhan et al. 2013):



Le superphosphate simple (SSP = 15-18% P_2O_5) est formé par l'attaque de la roche phosphatée par l'acide sulfurique selon la réaction:



L'acide phosphorique produit va réagir avec la roche phosphatée pour donner le phosphate mono-calcique suivant la réaction:



Le triple superphosphate (TSP = 44-48% P₂O₅) est obtenu par attaque du phosphate naturel par l'acide phosphorique par la réaction:



Les MAP et DAP sont obtenus par neutralisation de l'acide phosphorique par NH₃ suivant les réactions respectivement:



Les grands producteurs d'engrais sont les Etats-Unis suivi par le Maroc, la Chine, la Russie, la Tunisie, la Jordanie, le Brésil, Israël, l'Afrique du Sud, la Syrie, l'Egypte, l'Australie, le Sénégal, l'Inde, le Togo et le Canada (**Tableau 2**) (Sis and Chander 2003).

Les Etats-Unis ne sont pas seulement les plus grands producteurs d'engrais phosphatés mais aussi les plus grands consommateurs et exportateurs (Sis and Chander 2003, Abouzeid 2008).

Tableau 2 Production mondiale de phosphate et réserves.

Pays	Mines de production (million de tonnes)		Réserves
	2000	2001	
Etats-Unis	38,8	34,2	4000
Maroc	21,6	22	21000
Chine	19,4	20	10000
Russie	11,1	10,5	1000
Tunisie	8,34	8,1	600
Jordanie	5,51	5,5	1700
Brésil	4,9	5	370
Israël	4,11	4	800
Afrique du Sud	2,8	2,8	2500
Syrie	2,17	2,1	800
Sénégal	1,8	2	160
Togo	1,37	0,8	60
Autres	11,3	11,1	4000
Total	133	128	47000

Bien que la fertilisation a des effets positives sur la croissance des plantes mais l'utilisation excessive des engrais chimiques et des pesticides va aboutir à la contamination de l'aquifère causant une pollution de l'eau et des sols par les nitrates, les phosphates, les éléments traces métalliques (ETM) et d'autres polluants (Giuffré et al. 1997, Chien et al. 2011). Ces ETM proviennent de la roche mère phosphatée ou l'apatite (Rentería-Villalobos et al. 2010).

I.2 Les éléments traces métalliques

Les éléments traces sont des éléments présents naturellement dans les sols avec une teneur ne dépassant pas 0,1% dans les matrices minérales et 0,01% dans les organismes vivants (Alloway 1995). Giuffré et al. (1997) donnent des concentrations de quelques ETM dans la croûte terrestre (**Tableau 3**). Les ETM font partie des ET qui ont la propriété de perdre des électrons pour former des cations et qui ont une masse volumique supérieure à 5-6 g/cm³ (Huguet 2009, Duquette 2010).

Tableau 3 Teneur moyenne des ETM dans la croûte terrestre.

ETM	Cd	Cr	Cu	Zn	Ni	Pb
Moyenne dans la croûte terrestre (mg/Kg)	0,5	200	100	50	80	16

L'apatite contient une quantité d'ETM (Cd, Cu, Cr, Ni, Zn, Pb, As, etc...) et de radionucléides (U, Ra, Po, etc...) qui varie dans les produits finaux voire les engrais chimiques phosphatés en fonction de l'origine de la roche mère et du processus de production (Giuffré et al. 1997, Abdel-Haleem et al. 2001; Nziguheba and Smolders 2008, Roselli et al. 2009, Yamaguchi et al. 2009, Rentería-Villalobos et al. 2010).

Comme les engrais contiennent des ETM et dans la littérature on parle de la provenance principale de ces ETM de la roche mère, il est donc inévitable de discuter la présence de ces ETM dans les roches mères suivant leur origine et leur mode de formation. Dans le paragraphe ci-dessous, on se préoccupe pour parler de la formation des roches phosphates ainsi que de leur teneur en ETM.

I.2.1 Les formations et les distributions des roches phosphates dans le monde

La distribution des gisements et les principaux producteurs des roches phosphates est présentée dans la **Figure 4**. 70% des réserves de roches phosphates se trouvent dans les dépôts des roches sédimentaires marines de la province phosphogénique Méditerranéenne depuis l'âge de la fin-Crétacé et de l'Éocène. Cette province comprend le Maroc, l'Espagne, le Sahara, l'Algérie, la Tunisie, l'Égypte, Israël, la Jordanie, la Syrie, l'Arabie Saoudite, la Turquie et l'Irak. Ces réserves proviennent de dépôts de l'ancienne mer Téthys d'âge Mésozoïque et Tertiaire (Aydin et al. 2009, Aydin et al. 2010).

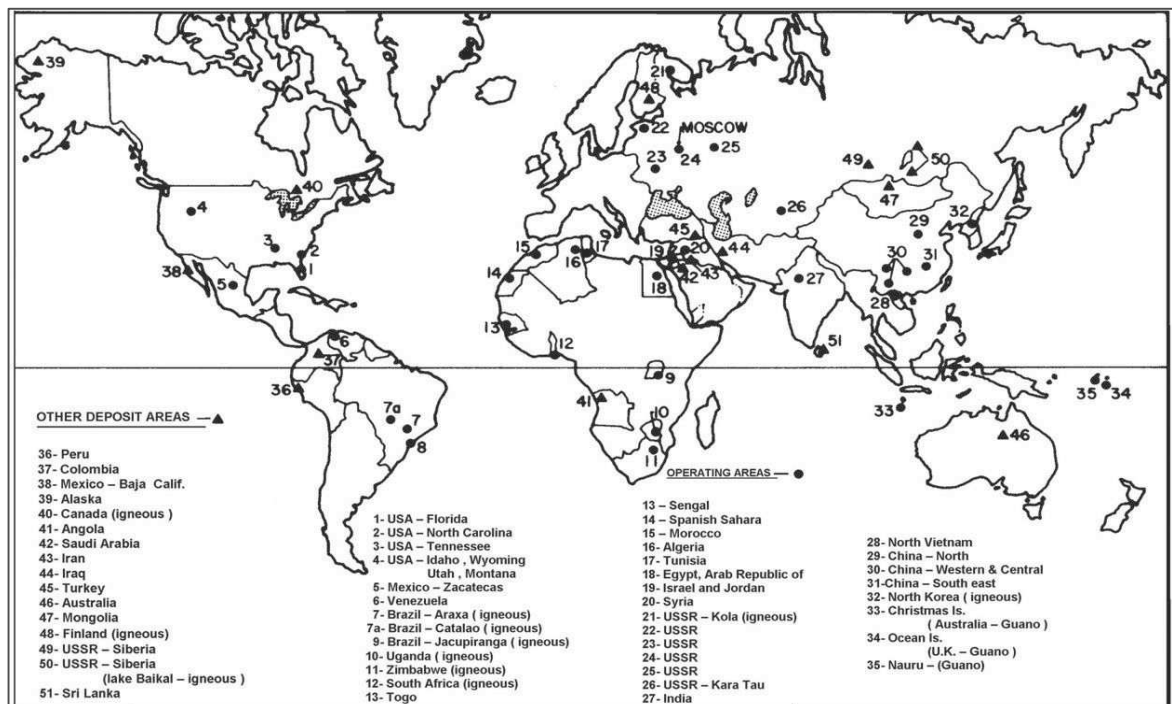


Figure 4 Distribution des roches phosphatées dans le monde et les principaux gisements exploités et quelques gisements connus mais non exploités (Abouzeid 2008).

Les principales ressources de roches phosphatées sont distribuées selon leurs types. Les roches phosphatées sédimentaires (75-80% des gisements de phosphore) contiennent 50 à 200 mg/Kg d'uranium et 2 à 20 mg/Kg de thorium, tandis que les dépôts d'origine ignées et métamorphiques (15-17% des gisements) contiennent au maximum 10 mg/Kg d'uranium mais sont plus riches en thorium et en terres rares (Rutherford et al. 1994, Rentería-Villalobos et al. 2010). Les 2 à 3% de gisements phosphatés restant ont des sources biogéniques provenant des accumulations des déchets d'oiseaux et de chauves-souris et ne contiennent pas d'ETM (Shahack-Gross et al. 2004, Aydin et al. 2010).

Le phosphore est présent sous forme de dahllite ($3Ca_3(PO_4)_2CaCO_3$) et de colophane ($3Ca_3(PO_4)_2.nCa(CO_3,F_2,O).xH_2O$) dans les roches phosphatées sédimentaires marines, la fluorapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$) et l'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$) sont trouvés dans les roches ignées et métamorphiques, le phosphore sous forme d'hydroxyapatite et d'hydroxyapatite de carbonate ($Ca_{10}(PO_4,CO_3)_6(OH)_2$) est présent dans les sources biogéniques. La dernière forme de phosphore dans l'environnement marin et dans les dépôts d'érosion est la francolite ($Ca_{10-x-y}Na_xMg_y(PO_4)_{6-z}(CO_3)_zF_{0.4z}F_2$) (Abouzeid 2008, Aydin et al. 2009, Cevik et al. 2010). Dans l'apatite ($Ca_5(PO_4)_3 [F, OH \text{ ou } Cl]$) plusieurs substitutions d'anions au niveau des F^- , CO_3^{2-} et OH^- peuvent se faire. Parmi ces substitutions, on peut observer la présence du silicate,

vanadate, aluminate, titanate et l'arsénite dans l'apatite. Le calcium peut être remplacé par l'uranium, le lanthane, le cadmium, le zinc, le magnésium, le strontium et le baryum. Parfois les chlorures remplacent les fluorures. Ainsi, la présence d'ETM dans les engrais dépendent des conditions de production et de l'origine de la roche phosphatée. Par exemple, dans les dépôts sédimentaires d'origine marine, la roche phosphatée est en contact avec du quartz, du mica, de l'argile, du calcaire et de la dolomite qui contiennent parfois des ETM dans leur composition (Aydin et al. 2009) d'où la particularité des phosphates à porter les ETM dans leur composition.

I.2.2 Les ETM dans les roches phosphates

La teneur d'ETM dans les roches phosphates dépend de l'origine de ces dernières. Les roches phosphatées d'origine sédimentaire contiennent plus d'ETM que les roches ignées (Chauhan et al. 2013). Par exemple, on trouve 0,035-0,3 mg Cd/Kg, 0,2-2,6 mg Mo/Kg, 5-25 mg Pb/Kg et 10-120 mg Zn/Kg dans les roches sédimentaires tandis que ces teneurs sont plus basses dans les roches magmatiques où il y a 0,09 et 0,22 mg Cd/Kg, 0,6-2 mg Mo/Kg, 3-24 mg Pb/Kg et 40-120 mg Zn/Kg (**Tableau 4**). Cette concentration varie selon le type de roches de même origine (argileux, acides, basiques, grès...). Le cadmium a une teneur entre 0,22 et 0,3 mg/Kg dans les roches argileuses sableuses d'origine sédimentaire et une teneur de 0,035 et 0,05 mg/Kg dans les carbonates et le grès de même origine (Redon 2009, Mar and Okazaki 2012). Dans certaines roches sédimentaires, le cadmium peut se trouver à des concentrations entre 3 et 150 mg/Kg mais cette concentration est plus faible dans les roches ignées (Mar and Okazaki 2012).

Tableau 4 Les concentrations d'ETM dans les roches d'origines magmatiques et sédimentaires (Redon 2009).

Eléments	Roches magmatiques			Roches sédimentaires		
	Roches basiques	Roches intermédiaires	Roches acides	Roches argileuses sableuses	Grès	Carbonates
	mg/Kg					
Cd	0,13-0,22	0,13	0,09-0,2	0,22-0,3	0,05	0,035
Co	35-50	1-10	1-7	11-20	0,3-10	0,1-3
Cr	170-200	15-50	4-25	60-100	20-40	5-16
Cu	60-120	15-80	10-30	40	5-30	2-10
Hg	0	0	0,08	0,18-0,4	0,04-0,1	0,04-0,05
Mn	1200-2000	500-1200	350-600	500-850	100-500	200-1000
Mo	1-1,5	0,6-1	1-2	0,7-2,6	0,2-0,8	0,16-0,4
Ni	130-160	5-55	5-15	50-70	5-20	7-20
Pb	3-8	12-15	15-24	18-25	5-10	3-10
V	200-250	30-100	40-90	100-130	10-60	10-45
Zn	80-120	40-100	40-60	80-120	15-30	10-25

Dans les roches phosphatées en provenance des Etats-Unis, le cadmium a une concentration plus élevée que celle en provenance du Brésil (**Tableau 5**). Le chrome se trouve en abondance dans les DAP et NPK, le Cu, Zn et Ni sont abondants dans les roches phosphatées et les TSP (Giuffré et al. 1997). Dans d'autres analyses, il s'est avéré que le phosphore est en corrélation positive avec le Zn, Cr, Pb, As, Cd et Ni présents dans 196 échantillons d'engrais de types RP, NPK, MAP, DAP et TSP provenant de 12 pays européens ce qui suggère l'affinité des ETM à se complexer avec le phosphate qui est un ligand complexant (Nziguheba and Smolders 2008).

Tableau 5 Teneur en ETM dans les roches phosphatées (RP) de quelques pays (Javied et al. 2009, Mar and Okazaki 2012).

Origine des RP	Cd	Cr	Pb	Zn	Ni	Co
	mg/Kg					
Etats-Unis	3-186	42	12	204-403	37	0,44
Maroc	3-165	291	7	261-345	26	0,48
Russie	0,1 <13	23,3	3	19	2	2,05
Tunisie	38-173	161	-	515	-	0,67
Jordanie	6 <30					
Brésil	4	70,5	44,5	299	116	-
Israël	12-32	56		372	-	0,37
Afrique du Sud	2 <13	1	35	6	35	-
Syrie	6,1-52	136	-	269	-	0,41
Egypte	8-74		4	13,2-121	15	385
Togo	44-179	75		143	-	1,2
Pakistan	7,2	17	89	67,2	28	9,4

I.2.3 Les ETM dans le sol

Le sol, la couche superficielle de la terre, supporte les plantes en leur fournissant les éléments nutritifs et l'eau. La principale source naturelle d'ETM dans les sols est le matériel parental, comme cité dans la section précédente. Mais de nos jours, les activités anthropiques, les industries métallurgiques, les poussières provenant des combustions et des embouteillages et les retombées atmosphériques naturelles (cendres volcaniques, feux de forêts...) et les activités agricoles telles que la fertilisation, l'irrigation et l'application de pesticides (Zhang and Pu 2011, Jiao et al. 2012, Defo et al. 2015) se sont intensifiées d'où un changement de cette teneur et un surplus d'ETM dans les sols, l'air et l'eau (Sappin-Didier et al. 1997, Sayyad et al. 2010). Dans les sols agricoles, le cadmium, l'arsenic, le zinc, le fer et le plomb considérés comme métaux traces, le La, Ce, Eu, Yt et Sa considérés comme éléments rares et les éléments radionucléiques tels que ^{238}U , ^{232}Th , ^{40}K et ^{226}Ra sont retrouvés suite à la fertilisation phosphatée (Giuffrè et al. 1997, Abdel-Haleem et al. 2001, Nziguheba and Smolders 2008, Roselli et al. 2009, Yamaguchi et al. 2009, Lin et al. 2010, Belon et al. 201).

Cette pollution des sols est devenue le sujet de nombreuses études, en Pologne, par exemple, les concentrations de Co, Cr, Pb et Zn ont augmenté dans les sols en raison des embouteillages, à Tokyo, le Cd est estimé à 0,05 mg/Kg, le Pb et Mn à 0,5 mg/Kg dues aux retombées de poussière (Kabata-Pendias 2011). Nziguheba and Smolders (2008) ont montré que l'apport de Cd, As et Cr par les engrais était beaucoup plus important que les dépôts atmosphériques sur les sols agricoles Européens. Cette hypothèse est en accord avec Nicholson et al. (2003) et Belon et al. (2012) qui ont trouvé une contribution plus importante de ces ETM suite à l'ajout d'engrais que par les dépôts atmosphériques (**Tableau 6**). Denaix (2007) mentionne que 68% du plomb et 40% du cadmium qui s'accumulent dans les sols proviendraient des retombées atmosphériques diffuses alors que seulement 1% du plomb et 2% du cadmium proviendraient de l'utilisation d'engrais. Pour l'As et le Pb, 58 à 85% de l'apport annuel total dérive des dépôts atmosphériques tandis que l'usage d'engrais contribue entre 5 à 30%. Notons que 55% et 8% seulement du cadmium dans le sol Chinois provient de l'atmosphère et de l'utilisation d'engrais respectivement (Luo et al. 2009). Lors de la production d'engrais phosphatée, dans son étude, Pacyna (1984) estime une émission de cadmium de 1,8 g/T de fertilisants, 0,42 g Pb/T et 15,2 g Zn/T de fertilisants. Jen and Singh (1995) rapportent que Singh et al. (1991) montrent une contribution des dépôts atmosphériques de 50 et 20% de la concentration totale de Cd dans les graines d'avoine et les carottes respectivement. De Temmerman et al. (2009) détermine une

corrélation entre le mercure de l'air et sa concentration dans les feuilles des laitues, des endives et des épinards etc. et concluent que l'exposition au mercure atmosphérique est la plus importante source pour l'accumulation de cet élément dans ces végétaux. Le plomb trouvé dans les feuilles et les tissus des grains de maïs cultivées dans un sol près d'une entreprise de zinc a été prouvée par son entrée par voie atmosphérique et absorption foliaire (Luo et al. 2011). Ainsi, les ETM peuvent également s'accumuler dans les végétaux par voie atmosphérique et pas seulement par les engrais.

Tableau 6 Moyenne des ETM ajoutés aux sols par les dépôts atmosphériques et les engrais utilisés.

	Apport des ETM (g/ha/an) aux sols par											
	Les dépôts atmosphériques ^a						Les engrais ^c					
	As	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn	As	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
France	0,5	0,2	2,4	2,9	7,7	55,7	1,3	2,5	28,6	5,7	2,3	83,5
Royaume-Uni ^b	3,1	1,9	7,5	16	54	221	1,2	2,1	46,6	28,6	11,4	89,7
Chine ^d	28	4,0	61	58	202	647	6,7	0,9	28,3	4,12	12,8	64,5
Moyenne Européenne	2,0	1,9	9,3	10	38	227	2,3	1,6	20,7	3,6	1,0	43,1
Californie ^e	-	-	-	-	-	-	4	6	20	5	125	40

^a Résultats obtenus par une compilation des données faite par Belon et al. (2012) sauf pour la moyenne des 12 pays Européens évalués par Nziguheba and Smolders (2008) pour l'apport d'ETM par les dépôts atmosphériques et les engrais.

^b Etude menée pour les deux contributions par Nicholson et al. (2003) au Royaume-Uni et aux pays du Wales.

^c L'apport des ETM en France et dans la moyenne des pays Européens est évalué par rapport à l'ajout d'engrais phosphaté seulement (Nziguheba and Smolders 2008).

^d Valeurs obtenues par Belon et al. (2012) pour l'apport par les dépôts atmosphériques et par Luo et al. (2009) pour l'apport d'ETM par les engrais inorganiques.

Parmi ces ETM, le cadmium a attiré l'attention de plusieurs chercheurs puisque ce métal est peu mobile par rapport aux nutriments (François et al. 2009) et son potentiel d'accumulation dans les sols agricoles et les plantes est en relation avec la santé humaine lors de l'ingestion du blé, des bananes et des laitues (Grant et al. 2010, Guo et al. 2013).

En raison de cette accumulation et de la possibilité de transfert des ETM du sol aux plantes, la CEQCs (Canadian Environmental Quality Guidelines), a élaboré des normes des teneurs maximales de quelques ETM dans les sols (mg/Kg) (**Tableau 7**).

Tableau 7 Teneurs maximales des ETM dans les sols.

	Cd	Pb	Cu	Zn	Ni	Cr	Hg	Se
CEQCs 2007	1,4	70	63	200	50	64	6,6	1

La teneur totale des ETM dans les sols ne donnent de renseignements ni sur la mobilité ni sur la disponibilité de ces derniers. Chaque pays a ses propres normes ou seuils concernant la teneur

acceptable d'ETM dans les sols puisque le type de sol, le fond géochimique de la région, les plantes cultivées et les diverses applications d'engrais diffèrent d'un pays à l'autre (FAO 2006b). L'US EPA 1999 a identifié la teneur, la fourchette de valeurs de quelques ETM dans les fertilisants phosphatés et l'application annuelle maximale (**Tableau 8**) (Kabata-Pendias 2011).

Tableau 8 Teneur des ETM dans les fertilisants phosphatés (Kabata-Pendias 2011).

	Cd	Cu	As	Ni	Cr	Pb	Zn
Moyenne (mg/Kg)	65	56,6	11,3	27,5	173,2	12,2	240,2
Min/max (mg/Kg)	0,15/250	0,2/1170	0,5/20	0,5/151	63/896	1/200	31,3/1150
Application maximale (Kg/ha/an)	0,113	0,327	0,018	0,095	1,650	0,282	0,971

Ces teneurs ne sont pas les mêmes dans tous les pays. En Turquie, les limites en Ni, Cr, Zn et Hg dans les fertilisants sont fixées à 120, 270, 1100 et 5 mg/Kg respectivement (Uysal et al. 2010). Les valeurs limites en Allemagne sont 1,5, 40, 80, 2, 150 et 1 mg/Kg pour Cd, As, Ni, Cr (VI), Pb et Hg respectivement (Weigand et al. 2013). Les valeurs limites dans les fertilisants au Canada sont fixées à 20, 75, 180, 500, 1850, 5 et 20 mg/Kg pour Cd, As, Ni, Pb, Zn, Hg et Mo respectivement et en Finlande, ces valeurs sont 1,5, 300, 25, 100, 600, 100, 1500, 1 et 1500 mg/Kg pour le Cd, Cu, As, Ni, Cr, Pb, Zn, Hg et Mo respectivement (Kabata-Pendias 2011). Au Liban, le ministère de l'agriculture a fixé des limites seulement pour le Cd, Cr et Pb dans les engrais et qui ne doivent pas dépasser 50, 400 et 150 mg/Kg respectivement pour les trois ETM. Ces valeurs sont largement supérieures à celles fixées par l'Allemagne, le Canada et la Finlande pour le Cd dans les engrais. Un manque de législation est aussi observé car il existe d'autres ETM nuisibles à la santé humaine qui ne sont pas évalués tel que l'arsenic, le nickel et le mercure.

La quantité d'engrais phosphatés appliquée aux sols diffère dans les pays Européens d'où une variation de la quantité d'ETM ajoutée par hectare et par an. Le **Tableau 9** montre une estimation de la quantité d'ETM ajoutée aux sols après différentes fertilisations phosphatées dans 12 pays Européens ainsi que la moyenne de ces ETM dans l'investigation réalisée par Nziguheba and Smolders (2008). Notons une application de 20 Kg/ha/an de P₂O₅ au Danemark et en Suède, une application de 50 Kg/ha/an de P₂O₅ aux Portugal et en Italie tandis que 78 Kg/ha/an de P₂O₅ peuvent être appliqués en Irlande (Nziguheba and Smolders 2008).

Au Liban, on note une application annuelle d'engrais de 1860 Kg/ha de terres arables qui est largement supérieure à celle utilisée dans les pays européens et les pays conscients aux impacts de cette fertilisation excessive. Ces engrais comprennent la quantité des engrais azotés, potassés et phosphatés. Les éléments nutritifs traditionnels, tels que les fumiers animaux et végétaux, ne sont pas inclus dans ce calcul. Les terres arables comprennent les terres définies par la FAO comme étant des cultures temporaires (les terres à deux cultures ne sont comptées qu'une fois) (Farajalla et al. 2010). Ce chiffre semble raisonnable après avoir interrogé les agriculteurs à la vallée de la Béqaa qui utilisent en moyenne 1800 Kg/ha/an d'engrais pour les pommes de terre, 450 Kg/ha/an pour le blé et 750 Kg/ha/an pour les oignons.

Tableau 9 Estimation de la quantité d'ETM ajoutée aux sols suite à la fertilisation phosphatée.

	Quantité d'ETM ajoutée g/ha/an	Moyenne d'ETM ajoutée aux sols
Cd	0,1 (Finlande et Suède) – 3,1 (Portugal)	1,6
Ni	0,7 (Suède) – 6,2 (Portugal)	3,6
Pb	0,3 (Belgique) – 2,5 (Irlande)	1,0
Zn	11,1 (Danemark) – 134,7 (Finlande)	43,1
Cr	1,5 (Finlande) – 42,3 (Portugal)	20,7
As	1,0 (Italie) – 7,7 (Irlande)	2,3

Les teneurs appliquées dans ces pays où le contexte géologique, climatique et pédogénétique diffèrent d'un pays à l'autre ne peuvent pas être utilisées pour juger les sols alcalins Libanais où règne un climat semi-aride à aride. Defo et al. (2015) ont pris comme référence les normes du Pb et Cd établies par la NSW EPA (1997) (New South Wales Environmental Protection Authority) qui limite des teneurs de 100 et 1 mg/Kg de Pb et Cd respectivement dans les sols et les normes pour le Cr et le Ni établies par l'USEPA (1990) et limitées à 2,67 et 75 mg/Kg pour les deux ETM respectivement en notant que les sols étudiés étaient des sols humides et acides. Dans certains pays, la majorité des sols, acides et humifères, est développée à partir de roches ou d'alluvions cristallines et/ou volcaniques, sous un climat froid et très arrosé. Ainsi l'évolution du fond géochimique des sols libanais permettra d'établir l'état complet des sols (contamination, teneur des ETM, origine de l'élément...) et d'établir les teneurs et normes propres aux contextes du pays qui sont principalement rares et parfois absentes.

I.2.4 Cycle des ETM dans le sol

L'accumulation des ETM, leur mobilité dans le sol et leur transfert aux plantes et aux végétaux ont fait le sujet de plusieurs études vu leur toxicité et leur impact sur la chaîne alimentaire (Giuffré et al. 1997, Sayyad et al. 2010). Plusieurs auteurs ont parlé du transfert des ETM, provenant de différentes sources d'eau d'irrigation ou de l'application des pesticides et de la fertilisation, du sol aux plantes et surtout aux laitues (Xiu-Zhen et al. 2009, Khan et al. 2010, Uwah et al. 2011, Akrong et al. 2012). Les sols utilisés étaient des sols sableux ou sableux limoneux et non argileux avec des pH acides à neutres, contrairement aux sols Libanais qui sont argileux, à pH basique et à salinité élevée. Les laitues ont un pouvoir élevé d'accumulation du Cd plus que les tomates et le maïs. Smical et al. 2008 ont trouvé que dans un sol non fertilisé, *Lactuca sativa* absorbe le Zn plus que dans un sol fertilisé même si ces sols ont un pH basique ou acide. Tandis qu'une accumulation importante Pb, Cu et Cd par les laitues est observée dans le sol acide fertilisé et pollué. L'hyperaccumulation du Cd confirme sa translocation en grande quantité dans la plante (Smical et al. 2008) ce qui montre la nécessité de comprendre le cycle des ETM dans le sol.

Le sol est un système complexe divisé en trois phases ou compartiments dynamiques en semi-équilibre (Kabata-Pendias 1993). La première phase est considérée comme le compartiment vecteur et représente la solution du sol, la deuxième phase considérée comme le compartiment accumulateur de métaux est la matrice solide et la troisième phase est le gaz (Kabata-Pendias 1993, Kabata-Pendias 2011). En plus de ces phases, les sols contiennent aussi de la matière organique, des algues, des champignons, des vers de terre etc. Les principales propriétés biogéochimiques du sol sont: 1) la distribution hétérogène des composants, 2) les altérations du sol, 3) la transformation des éléments, 4) le transfert entre les phases et enfin 5) la bioaccumulation (Kabata-Pendias 1993). Suite à l'altération de la roche mère, il y a libération de minéraux primaires qui seront disponibles aux plantes et des ETM qui vont constituer le pool endogène appelé fond pédogéochimique. Ces minéraux primaires constitués de quartz, d'oxydes de titane et de feldspath vont ensuite former les minéraux secondaires comme certains phyllosilicates (la kaolinite, l'illite et les montmorillonites), les oxydes de fer, d'aluminium et de Mn et des carbonates qui vont alimenter la solution de sol (Manceau et al. 2002). La roche mère altérée peut être formée de la roche sous-jacente ou par des sédiments provenant des rivières et des mers, ici on parlera de sols alluviaux, ou de l'action du vent, les sols éoliens ou des sols de cendres volcaniques (FAO and IFA 2000). Le second pool d'ETM est issu d'apports

exogènes provenant de l'activité humaine: de façon diffuse et par voie atmosphérique ou de façon ponctuelle par l'apport de déchets contaminés soit de façon répétée et cumulative par l'activité agricole (Fernandez-Cornudet 2006). Après minéralisation, transformation et décomposition des organismes vivants, la matière organique se forme. Les minéraux néoformés et la matière organique peuvent jouer un rôle dans la sorption des métaux présents dans la solution de sol. Le comportement des éléments traces métalliques dépend de la spéciation de ces derniers et de leur origine (exogène ou endogène) (**Figure 5a**). Dans le sol, les ETM peuvent s'associer aux différents constituants du sol sous les formes: a) ionique libre, complexée ou sous forme colloïdale dans la solution du sol, b) et c) adsorbée à la surface des constituants organiques ou minéraux, d) absorbée par les méso et microorganismes et enfin incluse dans les minéraux primaires ou secondaires suite à une précipitation, co-précipitation ou diffusion dans le réseau cristallin (**Figure 5b**). Dans la solution du sol, les ETM peuvent être sous forme d'ions libres, des formes complexées avec la matière organique dissoute ou des formes associées aux phases colloïdales.

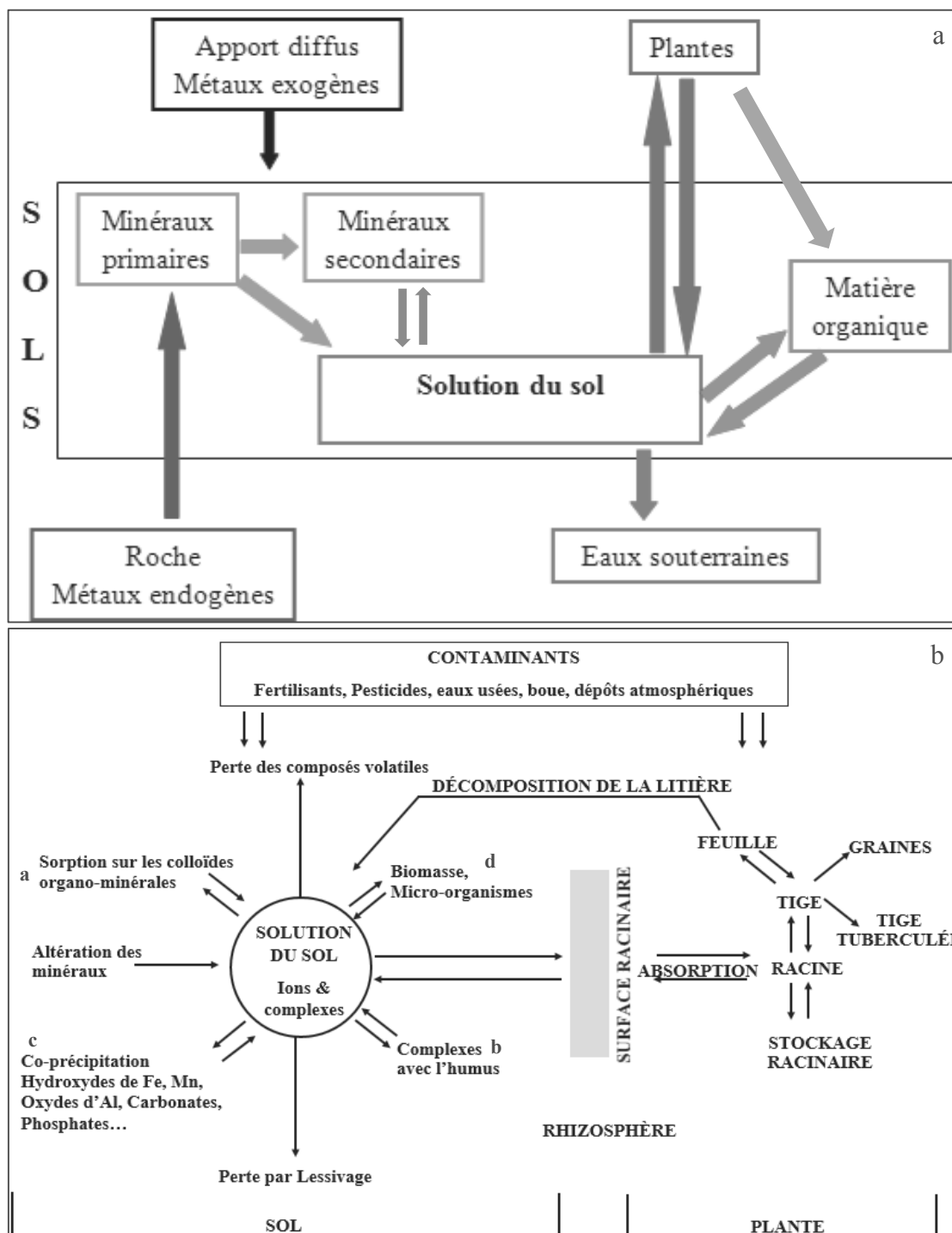


Figure 5 a) Cycle des métaux dans le sol (Denaix 2007) et b) Dynamique des métaux dans le système sol-plante (Fernandez-Cornudet 2006).

I.2.5 Mécanismes de fixation

La matrice solide du sol est constituée de différentes phases organiques et minérales: matière organique, oxydes et oxy-hydroxydes, phyllosilicates, carbonates, phosphates, minéraux primaires, etc. qui vont réagir différemment avec les ETM. Ainsi, le comportement de ces éléments et leur distribution dans le sol sont des processus dynamiques et interactifs affectés par les propriétés de cette matrice. Il est donc essentiel de connaître la localisation des métaux dans ces différentes phases afin de prévoir leur mobilité dans le système sol-eau. Tout d'abord commençons par les différents mécanismes de rétention (d'adsorption/désorption, précipitation/dissolution, co-précipitation, substitution et inclusion) à la surface et à l'intérieur d'un solide dans la solution du sol (**Figure 6**) (Tu et al. 2000, Chen W. et al. 2007, Denaix 2007).

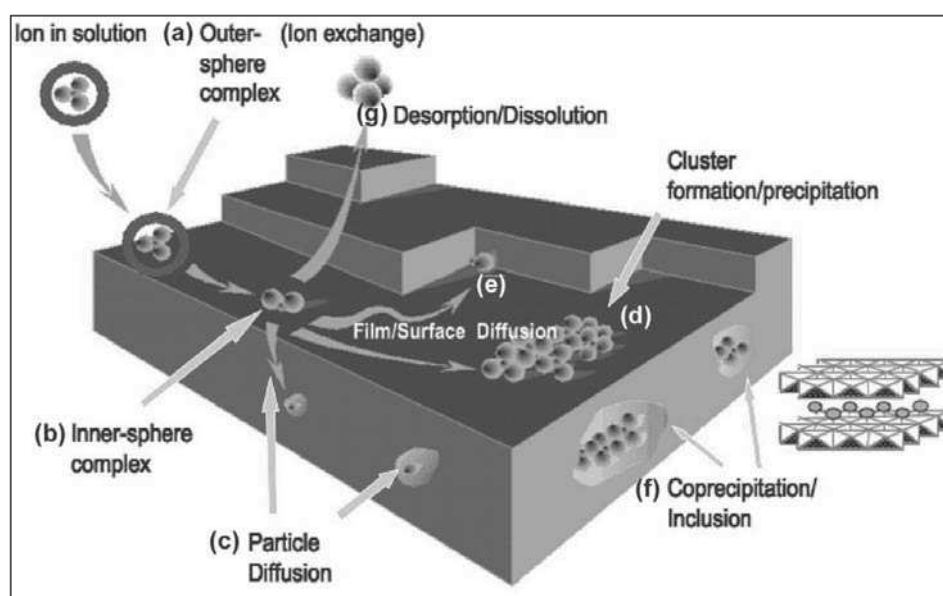


Figure 6 Principales interactions entre un atome et un solide à l'interface solide/liquide: a) adsorption d'un ion via la formation d'un complexe de sphère externe; b) perte de l'eau d'hydratation et formation d'un complexe de sphère interne; c) diffusion et substitution isomorphique à l'intérieur du minéral; d) diffusion rapide latérale et formation d'un polymère de surface; e) adsorption sur un rebord qui optimise le nombre de liaisons à l'atome; f) durant la croissance de particule, les polymères de surface s'intègrent dans la structure; g) l'ion adsorbé peut retourner en solution, soit par l'équilibre dynamique, soit par des réactions rédox de surface. Petite figure à droite montre l'incorporation des ions métalliques dans l'espace interfeuillaire de l'argile (Sparks 2005).

Mais il faut noter que parmi ces interactions de piégeage, la sorption est la plus courante et la plus importante et qui désigne la perte d'un soluté dans la solution aqueuse (Sposito & Schindler 1986). Les mécanismes intervenant dans la sorption d'un ion sont: la complexation de sphère externe, la complexation de sphère interne et la nuée d'ions diffus (**Figure 7**).

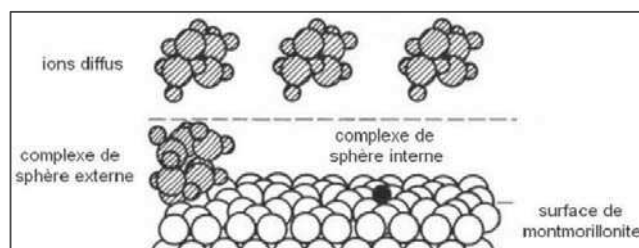


Figure 7 Modes de sorption des cations sur la surface de montmorillonite (Sposito 2008).

1.2.5.1 L'adsorption et la désorption

C'est le phénomène de transfert des ETM de la phase solide vers la solution du sol et vice-versa (Bradl 2004). La matière organique, les argiles, les oxydes (oxydes, hydroxydes et oxyhydroxydes) d'Al et de Fe sont d'excellents adsorbants d'ETM grâce à leurs grandes surfaces spécifiques. On distingue l'adsorption chimique (adsorption spécifique ou chimisorption) et l'adsorption physique (adsorption non spécifique ou physisorption).

L'adsorption chimique ou spécifique met en jeu des liaisons fortes de type liaisons covalentes ou ioniques entre les ions et les constituants du sol. La stabilité de ce type de liaison dépend du pH du sol et des propriétés spécifiques de l'ion sorbé telles que le rayon ionique et l'état d'hydrolyse de l'ETM. La valeur de la constante de dissociation (pK) de la réaction qui détermine l'adsorption ou non du métal sur la surface minérale ou sur la substance organique. L'adsorption augmente, généralement, quand le pK décroît. C'est une complexation de surface entre l'ion métallique et les groupements anioniques en surface fonctionnant comme ligand inorganique (OH^- , Cl^- , SO_4^- et CO_3^{2-}), de type complexe de sphère interne (Manceau et al. 2002, Bradl 2004, Kabata-Pendias 2011).

L'adsorption non spécifique implique des forces d'attractions électrostatiques de type Van der Waals ou liaisons ioniques qui sont plus faibles que les liaisons covalentes. Dans ce cas, le métal forme un complexe de sphère externe avec la surface puisque les atomes du métal sont présents dans une sphère de molécules d'eau enrobant les particules du sol. Ce type d'adsorption est réversible (Manceau et al. 2002).

L'adsorption des métaux dépend de la teneur en argiles, en matières organiques, de la CEC du sol et du pH.

La désorption est le phénomène inverse de l'adsorption, par laquelle les molécules ou les atomes adsorbés se détachent du substrat pour passer dans la solution du sol suite à la diminution de la concentration en ces éléments dans le sol grâce à leur prélèvement par les plantes (Huguet 2009) (**Figure 6**).

1.2.5.2 La précipitation et la dissolution

La précipitation est caractérisée par la croissance d'une nouvelle phase minérale, utilisant la surface minérale initiale comme support. Ce phénomène a lieu quand les sites d'adsorption spécifique du sol sont saturés. On parle de précipitation homogène lorsque le précipité se forme seul. Les métaux précipitent sous forme de carbonates, d'hydroxydes, de phosphates et de sulfures (Huguet 2009).

La dissolution est le phénomène inverse de la précipitation et dépend du pH.

1.2.5.3 La co-précipitation

La co-précipitation des métaux est définie par Alloway (1995) et Sposito (2008) comme la précipitation simultanée de plusieurs éléments métalliques sans que n'entrent en jeu de mécanismes particuliers. Les minéraux argileux, les oxydes de Fe et de Mn, les carbonates de calcium, les phosphates et les sulfures sont les principales formes de co-précipitations des métaux. Ce mécanisme se produit quand une phase minérale précipite et incorpore un élément exogène dans sa structure cristalline.

1.2.5.4 La substitution

C'est le remplacement d'un atome par un autre de charge, d'électronégativité et de taille similaire dans le réseau cristallin. La différence entre les rayons ioniques ne doit pas dépasser 15% et la charge ne doit pas différer de plus d'une unité (Huguet 2009).

1.2.5.5 L'inclusion

C'est le piégeage mécanique d'impuretés dans les pores du sol lors de la croissance des minéraux. Dans leurs études sur un sol contaminé par les poussières d'une fonderie

pyrométallurgique de Pb, Sobanska et al. (1999) ont trouvé que la majorité des particules de Pb (< 5 µm) est piégée dans le sol.

Les phyllosilicates sont impliqués dans le type d'interaction électrostatique ou échange ionique du fait qu'ils possèdent une charge de surface permanente négative résultant des substitutions isomorphiques dans la structure. Alors que les hydroxyles en bordure des aluminosilicates, les hydroxyles des oxydes métalliques, les groupements carboxyles et phénols de la matière organique sont plutôt impliqués dans le type complexation dépendant du pH. Les oxyhydroxydes métalliques (Fe et Mn) ainsi que les aluminosilicates amorphes jouent un rôle important dans les réactions d'adsorption spécifique. Cependant certains métaux peuvent former avec les ligands de surface des liaisons de nature électrostatique. De plus, l'affinité entre l'ETM et les constituants du sol varie selon le métal et le constituant considéré (**Tableau 10**) (Fernandez-Cornudet 2006).

Tableau 10 Série d'affinité empirique des ETM pour les constituants du sol (Fernandez-Cornudet 2006).

Matériel	Séquence d'affinité
Oxyde d'Al amorphe	Cu> Pb> Zn> Ni> Co>Cd
Oxyde de Fe amorphe	Pb> Cu> Zn> Ni> Cd> Co
Goethite (FeOOH)	Cu> Pb> Zn> Cd
Hématite	Pb> Cu> Zn> Co> Ni> Mn
Oxydes de Mn	Pb> Cu> Mn=Co> Zn> Ni
Acides fulviques (pH 5)	Cu> Pb> Zn
Acides humiques (pH 4-6)	Cu> Pb>> Cd> Zn

Une fois appliqués au sol, ces ETM peuvent soit persister dans le sol, soit devenir disponibles pour les plantes, dans le cas de sols acides, mais avec un risque d'accumulation dans le sol et un transfert à la chaîne alimentaire (McLaughlin et al. 1996). Comme cité dans la section précédente, les métaux dans les sols sont fortement fixés aux argiles ou aux composés humiques et ne sont pas entraînés par l'eau. Ils peuvent être inclus dans un cristal et ne passeront pas facilement en solution alors qu'un cation métallique fixé par échange d'ion sur une surface argileuse sera plus facilement échangeable et mobile. Des approches chimiques, dans la littérature, sont utilisées pour évaluer la localisation des ETM dans les sols et leur

mobilité. Par exemple, des auteurs distinguent 5 fractions: la fraction échangeable (force ionique), fraction adsorbée et/ou liée aux carbonates (acido-soluble), fractions réductibles liées aux oxydes de Fe et Mn plus ou moins bien cristallisés, fraction oxydable ou fraction liée à la matière organique et sulfures) et la fraction résiduelle (silicate et argile) (**Figure 8**).

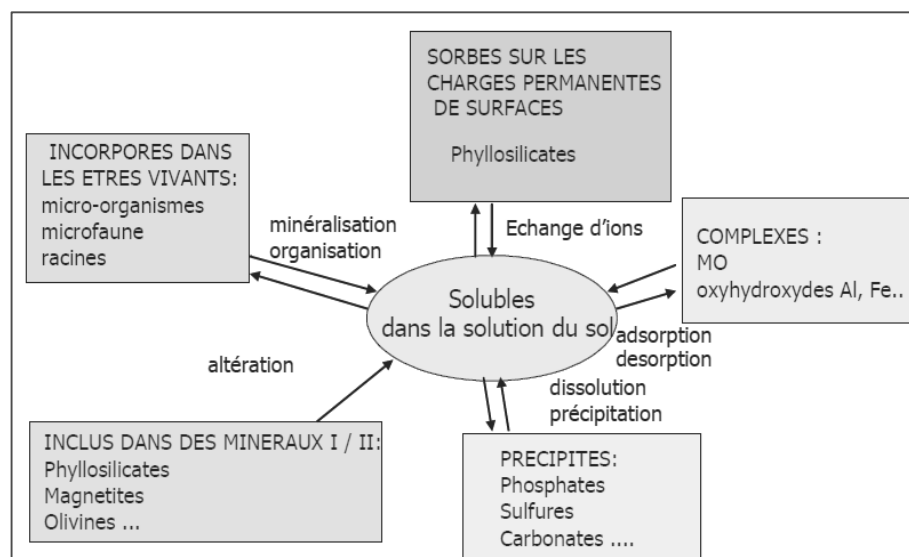


Figure 8 Localisation théorique des métaux dans les différentes phases du sol (Denaix 2007).

I.2.6 Influence des paramètres du sol sur la spéciation des ETM

Dans le sol, les ETM peuvent être sous forme libre ou liés à des particules de sol. Un élément n'est toxique que s'il est sous forme libre donc disponible (Smical et al. 2008). Plusieurs approches chimiques sont développées dans la littérature pour évaluer la mobilité des ETM. On distingue les extractions sélectives (Lindsay and Norvell 1978, Rauret 1998, Ünver et al. 2013) et les extractions séquentielles (Tessier et. 1979, Chaignon et al. 2003, Matong et al. 2016, Mittermüller et al. 2016) (**Figure 9**).

Localisation	Mobilité		
	Immobile	Peu mobile	Très mobile
Solution			Dissous
Minéraux argileux		Adsorbés (complexes à sphère interne)	Adsorbés (complexes à sphère externe)
Oxydes et hydroxydes de Fe, Al, Mn	Métaux à l'intérieur des réseaux cristallins	Adsorbés (complexes à sphère interne)	Adsorbés (complexes à sphère externe)
Carbonates	Métaux à l'intérieur des réseaux cristallins	Métaux à la surface des réseaux cristallins	
Substances humiques		Adsorbés (complexes à sphère interne)	Adsorbés (complexes à sphère externe)

Figure 9 Localisation et mobilité des ETM dans le sol (Sirven 2006).

La mobilité et la disponibilité des ETM dans les sols sont en relation avec les propriétés du sol comme le pH et le potentiel redox qui sont les paramètres les plus importants. La solubilité des ETM est en relation avec la CEC, la présence de l'argile, la matière organique, les microorganismes, les oxydes de Fe, Mn et d'Al (Chuan et al. 1996, McBride et al. 2004, Moral et al. 2005, Chen S. et al. 2006, Rajaie et al. 2006, Grant et al. 2010).

1.2.6.1 pH et potentiel redox du sol

Le pH des sols varie normalement entre 4 et 8,5, en fonction de la roche mère, et le potentiel redox Eh entre 400 et 2200 mV (Kabata-Pendias 2011). En milieu acide, les ions métalliques se trouvent mobiles dans la solution du sol et la solubilité des éléments cationiques stables (Cd, Ni, Pb, Cr (III)) augmente avec la diminution du pH (**Figure 10**). La solubilité des éléments anioniques stables comme Cr(VI) et As diminue avec l'acidification (Marseille and Denot 2007, Violante 2013).

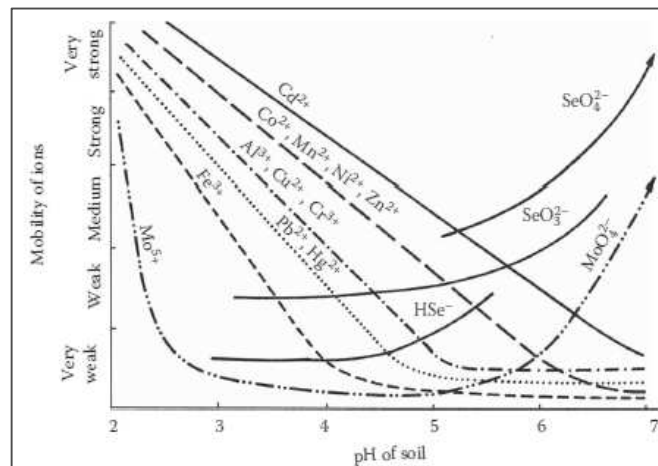


Figure 10 Concentrations des ETM dans la solution de sol dans un sol sableux podzolique gleyique (Kabata-Pendias 2011).

La disponibilité et la solubilité des cations Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} dans le sol diminue quand le pH augmente (Chuan et al. 1996). La dissolution et la mobilité du Cd, Cu, Pb et Zn sont facilitées en milieu acide (Sterckeman et al. 2000 d'après Adriano 1986). A pH élevé, l'adsorption du Cd par les sites de surface du sol augmente et le Cd va former le $\text{Cd}(\text{OH})^+$, la solubilité du Zn va diminuer de 100 unités avec l'augmentation du pH d'une unité quand ce dernier est entre 5 et 8 (Singh and Myhr 1998, Kashem and Singh 2001) et la solubilité du Pb diminue quand le pH du sol passe de 3 à 6,5 (Sauvé et al. 1998).

En effet, la concentration en cations métalliques libres diminue avec l'augmentation du pH d'où l'amélioration de la mobilité et de la disponibilité des métaux dans le sol à un pH acide. La présence de carbonates, silicates, sulfates et d'oxyhydroxydes de Fe va jouer un rôle sur le changement de pH. La liaison des métaux à des ligands organiques ou à des colloïdes peut accroître leur mobilité à un pH neutre ou basique (Camobreco et al. 1996, Richards et al. 1998, Karathanasis and Johnson 2006, Sayyad et al. 2010). Le Cu est adsorbé sur les oxydes de Mn et sur la matière organique à pH acide et sur les oxydes de Fe et les minéraux argileux à pH alcalin (Chaignon 2001).

Le pH et le potentiel redox du sol sont inversement proportionnel vis-à-vis la solubilité des ETM. La solubilité du Cd, Zn et Ni a diminué quand le potentiel redox augmente et le pH diminue (Kashem and Singh 2001, Huynh 2009) mais parfois ce potentiel n'a pas d'effet significatif sur la solubilité de Pb^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} dans un sol contaminé (Chuan et al. 1996).

La fertilisation phosphatée peut changer les propriétés du sol au niveau du pH et des charges de surface négatives et peut entrer directement en liaison avec les ETM du sol (Grant and Bailey

1997, Chen S. et al. 2006). Le phosphate acidifie le sol et augmente la capacité d'échange cationique (CEC) dans le sol d'où un changement du comportement des ETM qui seront adsorbés par le sol (Chen S. et al. 2006).

1.2.6.2 CEC et type d'argile

La capacité d'échange cationique (CEC) est la concentration en charges négatives présentes sur les sites d'échange. Plus le pH est élevé, plus la CEC s'accroît et la quantité de cations adsorbée augmente et la mobilité diminue (Chaignon 2001).

Les phyllosilicates dont les feuillets sont constitués de couches de tétraèdres SiO_4 et de couches d'octaèdres $\text{Al}(\text{OH})_6$ (**Figure 11a**), présentent une charge de surface négative, leur donnant la capacité d'adsorber en surface les métaux cationiques (Kabata-Pendias 1993). Cette capacité à lier les cations métalliques est en relation directe avec la CEC de l'argile. Plus la CEC est grande, plus l'adsorption des cations est importante (Le Roux 1972, Denaix 2007, Kabata-Pendias 2011). Ces liaisons sont réversibles et le métal cationique peut être remplacé par un autre présent dans la solution du sol (Huguet 2009, Huynh 2009).

Les propriétés et la composition des minéraux argileux diffèrent l'un à l'autre et surtout au niveau de la CEC. La CEC varie selon le type du minéral argileux: montmorillonite > vermiculite > illite, chlorite > kaolinite (Manceau et al. 2002, Kabata-Pendias 2011). La capacité d'un minéral à fixer un ETM est proportionnelle à sa CEC, plus la CEC est élevée plus la quantité d'ETM fixé à l'argile est importante. Le **Tableau 11** montre que la montmorillonite et la vermiculite ont une grande capacité de sorption vues leur grande surface totale et leur CEC élevée (Kabata-Pendias 2011). Manceau et al. (2002) définissent une CEC moyenne pour la montmorillonite de 100 méq/100 g, l'illite 30 méq/100 g et la kaolinite 8 méq/100 g.

Tableau 11 Propriétés et compositions des minéraux argileux (Giroud and Bottero 1972, Kabata-Pendias 2011).

Minéraux argileux	Surface totale (m^2/g)	CEC (milliéquivalent/100g)
Montmorillonite	280-800	80-150
Vermiculite	50-800	100-150
Illite	65-100	10-40
Chlorite	25-150	10-40
Kaolinite	7-30	3-15

Ces argiles contiennent des quantités négligeables d'ETM dans leur structure mais leur capacité d'adsorber les ETM à leur surface est importante. Généralement, on distingue deux types d'argile selon la structure des feuillets:

- Le minéral argileux 1: 1 comme la kaolinite. Il est formé d'une couche de tétraèdre de silicium (Te) et d'une couche d'octaèdres d'aluminium (Oc) ayant en commun un O^{2-} . La kaolinite est un feuillet sans substitution et de formule générale $Si_4 Al_4 O_{10} (OH)_8$. Dans ce type de minéraux, les liaisons entre les feuillets sont des liaisons hydrogène (**Figure 11b**).
- Le minéral argileux 2: 1 comme la montmorillonite, l'illite, la vermiculite ou le chlorite possède des feuillets de type Te/Oc/Te c.à.d. une couche octaédrique entre deux couches tétraédriques (**Figure 11c**).

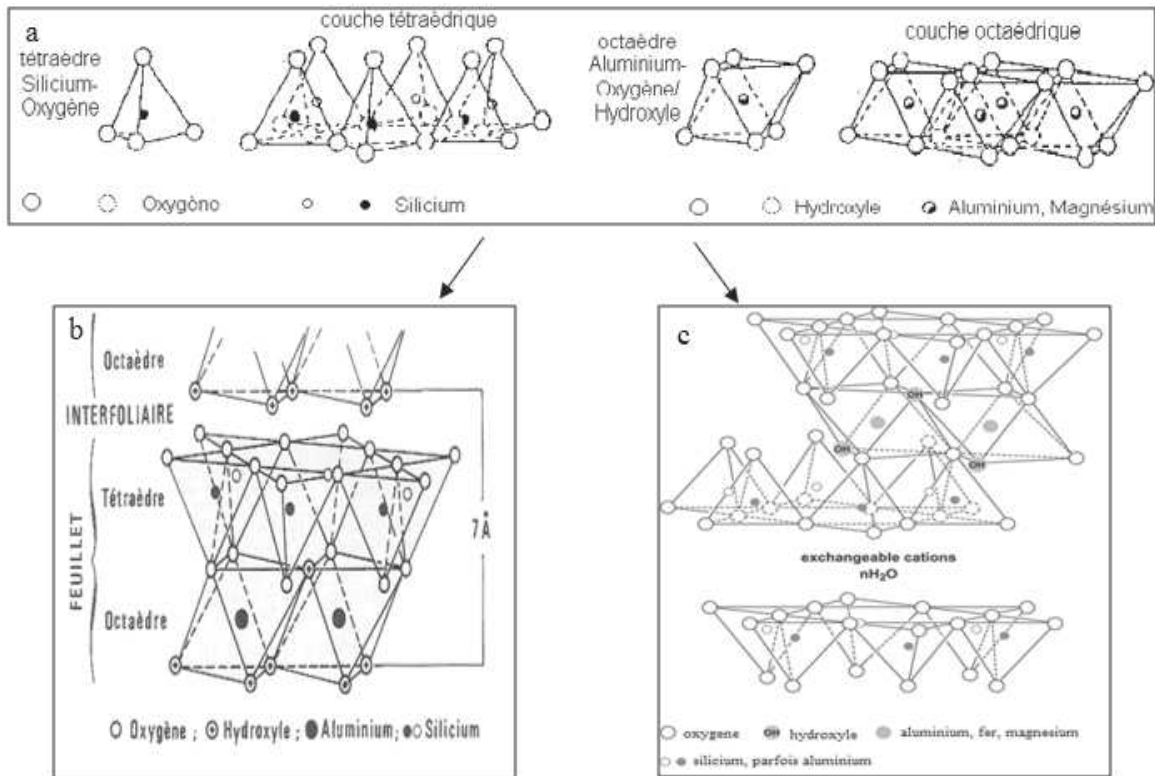


Figure 11 a) Schématisation des couches tétraédriques et octaédriques, b) Structure d'un feuillet de kaolinite et c) Structure d'un feuillet de montmorillonite.

C'est dans la montmorillonite qu'on a une substitution de l'aluminium par le magnésium et le fer; dans l'illite le Si est remplacé par l'Al et des cations potassiques sont adsorbés dans l'espace interfoliaire pour assurer la liaison entre les feuillets et former des ponts. L'Al dans la chlorite est remplacé par le Fe et son espace interfoliaire comprend une couche composée de magnésium et d'hydroxyle et la vermiculite contient du Fe et du Mg dans sa couche octaédrique. A faible pH, le Cd est lié à la kaolinite, mais à $\text{pH} > 5$, le Cd se trouve adsorbé aux hydroxydes (Violante 2013).

1.2.6.3 Abondance des oxydes

Les oxydes de Fe et d'Al ont une CEC faible et quelques oxydes de Mn ont une CEC de 300 méq/100 g. Ces oxydes ont généralement une surface spécifique élevée (jusqu'à 800 m^2/g) leur référant une grande affinité d'absorber les ions. De plus, les oxydes de manganèse et de fer jouent le rôle de pièges pour les ETM, de la même façon que les argiles et les matières organiques. Le mécanisme de sorption par les oxydes se repose sur la substitution isomorphe de Fe^{2+} ou Fe^{3+} et des ions Mn, sur les réactions d'échange cationique et sur les effets d'oxydations des précipités des oxydes (Kabata-Pendias 2011). Un sol acide favorisera la mise en solution, donc la mobilité des métaux (**Figure 12**), à l'inverse un pH élevé favorisera

l'accumulation des métaux sous forme d'hydroxydes ou de complexes. Les oxydes de Fe ont montré une capacité de sorption importante pour les phosphates, molybdates et sélénates et sont dépendants du pH (Basta et al. 2005).

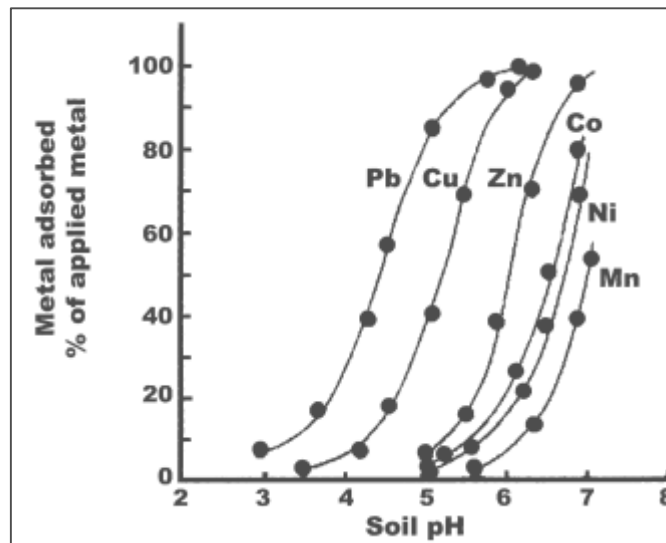


Figure 12 Adsorption des ETM sur la goéthite avec les pK_a de chaque ETM entre parenthèse: Pb (7,7), Cu (8), Zn (9), Co (9,7), Ni (9,9) et Mn (10,6) (utilisée par Basta et al. 2005).

Les ETM associés aux oxydes de Fe et Mn vont se dissoudre en condition redox d'où une solubilité du Cu, du Pb qui ont le même pKa (Chaignon 2001) et du Cd et Zn (Chuan et al. 1996). Ainsi, c'est la dissolution des oxyhydroxydes de Fe et Mn qui a un rôle important dans la solubilité des ETM associés à un potentiel redox faible (Davranche and Bollinger 2000).

1.2.6.4 Teneur en matière organique (MO)

Les éléments métalliques sont retenus par la matière organique sous forme échangeable ou complexe mais il faut prendre en compte le pH du milieu. En effet, la matière organique est un constituant du sol composée principalement de carbone et d'oxygène. Elle est formée entre autres d'acide humique et d'acide fulvique. Ces acides sont formés d'un mélange de molécules à grand poids moléculaire d'où leurs caractéristiques peu mobiles. Ils ont des noyaux aromatiques reliés par des chaînes aliphatiques et des groupements fonctionnels à caractère acide leur donnant une capacité à adsorber les protons et les cations métalliques (Dzombak et al. 1986) (**Figure 13**). Deux types de groupements fonctionnels sont majoritairement présents. Les groupements carboxyliques connus par les acides forts (pKa = 4,5 mais distribué entre 1 et 8) et les groupements phénoliques ou acides faibles (pKa = 10 mais distribué entre 7 et 13) et sont capables de se complexer aux ETM. Cette complexation est impliquée dans la diminution de la sorption des ETM et l'augmentation de leur mobilité dans le sol (mentionné par Ashworth

and Alloway 2008). Les Cd^{2+} et Hg^{2+} ont une préférence de complexation avec les ligands de thiols (-SH) tandis que les Fe^{3+} et Mn^{2+} avec les (OH^- et COO^-) et les Cu^{2+} , Zn^{2+} et Pb^{2+} forment des complexes avec les bases (mentionné par Basta et al. 2005). Ces groupements sont partiellement dissociés dans la solution du sol et sont à l'origine de la CEC de la matière organique. Les propriétés des Cu et Pb leur confèrent une grande affinité à former des complexes de sphère interne avec la matière organique (Basta et al. 2005). Manceau et al. (2002) définissent une CEC moyenne pour la matière organique de 200 méq/100 g. Une acidification du sol entraîne corrélativement une diminution de la CEC de la matière organique. Les interactions entre les ETM et la matière organique sont de type complexation mais une part d'échange d'ion est également à prendre en compte suivant le pH du milieu.

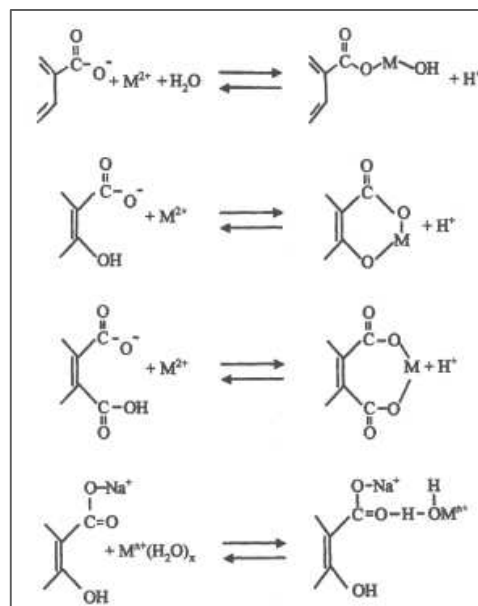


Figure 13 Complexation ETM et matière organique naturelle (Senesi 1992).

A un pH entre 6,5 et 8 et en présence de matière organique dissoute dans le sol, la solubilité du Pb augmente et ce métal va migrer en profondeur pour la formation des complexes organo-minéraux (Sauvé et al. 1998, Sterckeman et al. 2000). La sorption de la majorité des ETM par l'acide humique augmente avec l'augmentation du pH de la solution à l'exception du Hg et du Mn qui ne sont pas affectés (**Figure 14**). En effet, la dissolution de plusieurs complexes ETM-matière organique se fait à des pH supérieurs à 6 et 7 (Kabata-Pendias 1993).

Dans les sols riches en substance humique, la complexation du Cd, Ni et Cu, Zn, Co et Hg est importante (Gadd and Griffiths 1978, Chang and Page 2000, Kabata-Pendias 2011). La distribution des ions métalliques dans la solution du sol et leur adsorption par les acides humiques et fulviques a été évaluée. Le cuivre adsorbé par les acides fulviques est remplacé par le Ca, l'aluminium influence la liaison Pb-acide humique, l'aluminium et le magnésium

ont un effet sur la liaison Cu-acide fulvique et on observe une compétition entre Ca, Cu et Cd pour se lier à l'acide humique (Tipping 1998).

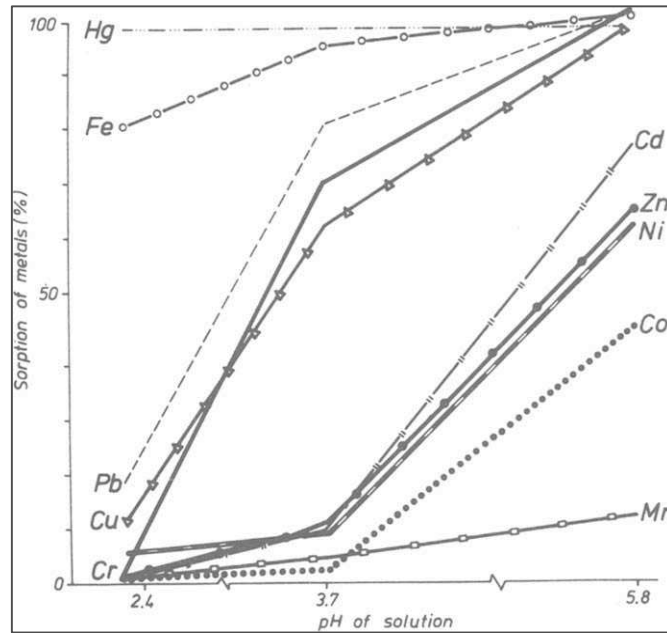


Figure 14 Effet du pH sur la sorption des ETM sur l'acide humique (Kabata-Pendias 1993).

La texture de ce dernier et de ces constituants dépend de la température du sol. À une température élevée, la matière organique se dégrade d'où une solubilisation et une mobilité des ETM suite à la libération d'acide organique.

La capacité à fixer les ETM sur la MO, les argiles ou les oxydes diffère en fonction du composant du sol et de l'ETM (**Figure 15**). Par exemple, le Cr, le Fe le Pb et l'Hg sont fortement liés à la matière organique et aux oxydes et hydroxydes mais sur l'argile, seul le Fe est fortement fixé (Kabata-Pendias 2011).

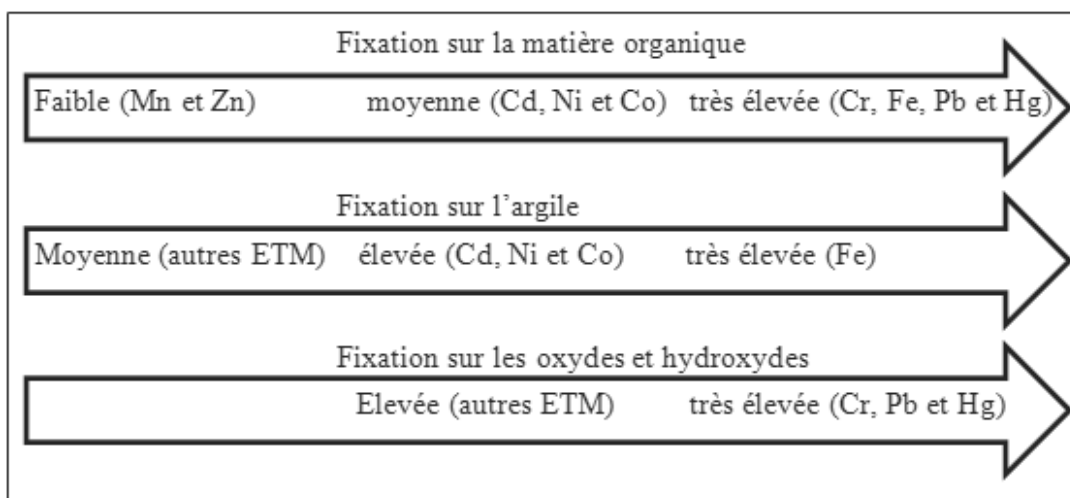


Figure 15 Pouvoir de fixer les ETM par la MO, l'argile et les oxydes/hydroxydes (Kabata-Pendias 2011).

1.2.6.5 Les microorganismes

Les microorganismes jouent un rôle dans la disponibilité et la mobilité des ETM dans les différentes couches du sol (Schlieker et al. 2001). Les microorganismes peuvent transporter les ETM dans leur cellule ou les expulser à l'extérieur, changer la charge des ETM, méthyler l'As, Hg, Pb et Se et enfin accumuler ou mobiliser les ETM (Kabata-Pendias 2011). En effet, la rhizosphère est le milieu où les activités microbiologiques et biochimiques sont intenses et les racines sont capables de mobiliser les métaux dans le sol en modifiant les concentrations ioniques de la rhizosphère, le potentiel redox, le pH et la formation de complexes organométalliques (Chaignon 2001). C'est Hiltner, un chercheur allemand, qui a introduit le terme de rhizosphère puisqu'il observa que l'activité des bactéries était plus intense dans l'environnement proximal des racines (Séguin et al. 2004, Hartmann et al. 2008). Certains auteurs considèrent la rhizosphère comme l'interface sol-racine, parfois la racine est incluse dans la définition, parfois on la définit comme la portion du sol où les racines influencent seulement l'activité microbienne. Alors que d'autres auteurs considèrent la rhizosphère comme étant au centre des interactions plante-sol-microorganisme (Duquette 2010).

Les principaux modes d'action des microorganismes sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation.

- La solubilisation provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitrique et sulfurique. Certaines bactéries chimiolithotrophes (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*) oxydent les formes réduites du fer et du soufre contenues dans les sulfures et produisent de l'acide sulfurique, susceptible de dissoudre les silicates, les phosphates, les oxydes et les sulfures, libérant ainsi les ETM. Les champignons et racines des plantes excrètent des acides afin d'augmenter l'absorption des nutriments; ainsi cette acidification va favoriser la mobilité d'autres éléments tels que les ETM qui ne sont pas indispensables pour le métabolisme végétal. Les sucres, les sidérophores qui sont des composés organiques de faible masse moléculaire produits par les champignons et les plantes, favorisent les déplacements des ETM et un transfert diffusif se fait jusqu'aux plantes dans lesquelles ils s'accumulent (Chaignon 2001, Renella et al. 2004).

- L'insolubilisation constitue le phénomène opposé. Certains acides organiques de faible masse moléculaire, comme les acides oxalique, citrique ou fumarique qui interviennent dans la complexation intracellulaire d'éléments nutritifs, peuvent être sécrétés dans le milieu extérieur. Ils limiteraient ainsi les transferts par des processus de complexation.

- La volatilisation repose sur l'action directe de certains microorganismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique. La bio-méthylation permet le transfert de groupements méthyl directement aux atomes des ETM tels que le Pb, Sn, As, Sb et Se, permettant leur volatilisation dans l'atmosphère (Kabata-Pendias 2011).

En effet, dans des conditions climatiques tropicales, sursaturées en eau ou anaérobiques, les *Thiobacillus ferrooxidans* vont former la pyrite (FeS_2) qui va précipiter avec le Cd, Co, Ni, Zn, Sn et Ti, rendant ces ETM moins solubles (Vochten and Geys 1974, Kabata-Pendias 2011).

De plus, certains microorganismes peuvent réduire les oxyhydroxydes de Mn, Fe et S en augmentant la solubilisation des ETM associés (Kabata-Pendias 2011).

L'influence du pH sur la disponibilité du Cu a été étudiée sur *Candida utilis*. A $\text{pH} > 7$, le complexe Cu-acide aminé était moins toxique qu'à pH faible. En effet, à pH acide, le complexe est dissout et l'ion Cu redevient soluble et libre (Gadd and Griffiths 1978).

1.2.6.6 Compaction et aération du sol

Généralement, les particules argileuses s'associant au sable et au limon vont déterminer la structure du sol. Et cette structure va influencer la porosité du sol, la rétention de l'eau et l'aération du sol.

On distingue deux types de pores, les macropores et les micropores. Les colloïdes du sol ont une surface très grande de $10\text{-}500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ et une affinité à transporter les ETM. Le zinc et le cuivre sont transportés par les colloïdes à charges négatives dans un sol contenant le plus de macropores (Karathanasis 1999, Barton and Karathanasis 2003). L'agriculture moderne repose sur l'utilisation d'engrais et de grandes machines qui provoquent le compactage des sols et la modification des propriétés physiques du sol et du taux de développement des plantes (Jusoff 1991) Le compactage va aboutir à une faible aération, une diminution des macropores et une humidité élevée qui va engendrer une diminution de l'oxygène du sol et une diminution de la capacité des racines à absorber les éléments du sol. Dans un sol compacté ou sous des conditions redox, les oxyhydroxydes de Fe et Mn sont dissous d'où une solubilisation des ETM associés comme le Cd et le Pb. Mais les ETM ayant une grande affinité pour ces oxyhydroxydes, comme le Pb, seront ré-adsorbés à nouveau par les ligands et oxydes non dissouts (Davranche and Bollinger 2000). En climat aride, les altérations physiques du sol sont favorisées tandis qu'en climat tropical, avec une température et une humidité élevées, on observe une altération chimique avec la formation de plusieurs minéraux argileux (Kabata-Pendias 2011).

Cependant, la compaction n'est pas seulement un paramètre affectant la spéciation des ETM dans le sol mais aussi une influence sur la morphologie et le développement des plantes comme on va voir dans le paragraphe suivant.

Une étude sur des plants de maïs a montré une réduction de la longueur des racines avec l'augmentation de la densité du sol (Pupin et al. 2009). Jusoff (1991), mentionne une diminution de 5% de la hauteur, 8% du diamètre et 20% du volume des *Pinus ponderosa* et *Pinus contorta* quand la densité du sol augmente de 1,07 à 1,08 mg/m³. Le suivi des enzymes du sol est fait depuis longtemps pour étudier la qualité des sols puisque, comme la population bactérienne, ils sont sensibles aux changements environnementaux et aux activités anthropogéniques tels que la compaction du sol et la présence d'ETM (Zhi-xin et al. 2006, Wang et al. 2007, Sardans et al. 2008, Pan and Yu 2011). Citons par exemple, Li et al. (2002) et Pupin et al. (2009) démontrent une diminution du nombre des bactéries en augmentant la densité du sol mais la moyenne trouvée est 217,5.10⁵ CFU/g de sol et 3,2.10⁶ CFU/g de sol respectivement dans ces études. Le nombre de champignons trouvé est beaucoup plus faible que celui des bactéries. Une densité de sol très élevée 1,73 et 1,74 a stimulé la croissance de champignons, une moyenne de 8.10⁵ CFU/g de sol par rapport au sol de faible densité allant de 1,35 à 1,70 avec une moyenne de 4.10⁵ CFU/g de sol. Ces nombres diminuent en passant à un profil de sol profond (10-20 cm) et diminuent en passant de la densité 1,35 à 1,70 (Pupin et al. 2009). Pupin et al. (2009) ont étudié l'effet de la compaction sur l'activité des phosphatases (Li et al. 2002), uréases (Li et al. 2002), déshydrogénase et même sur le nombre total de bactéries et de champignons (Li et al. 2002) et sur les bactéries nitrifiantes et dé-nitrifiantes.

I.2.7 Transfert, impact et toxicité des ETM

L'agriculture se trouve face à des problèmes de production des végétaux qui respectent les réglementations alors que les sols cultivés sont de plus en plus exposés aux contaminants d'ETM. D'après Carvalho (2006), les résidus des pesticides, insecticides, fongicides, herbicides et engrais chimiques phosphatés vont contaminer les sols et l'eau, s'accumuler dans la végétation et finalement entrer dans la chaîne alimentaire et générer des risques sur la santé animale et humaine. Ainsi, la définition des paramètres quantitatifs pour éviter les contaminants et minimiser leurs impacts sur la santé publique et l'amplification de la recherche qui portent sur les problématiques des transferts sol-plantes sont devenues une nécessité primordiale pour la sécurité publique (Denaix 2007).

Les ETM ne sont pas dégradables, s'accumulent principalement dans les horizons de surface des sols. Ils peuvent être absorbés par les végétaux qui constituent le premier maillon de la

chaîne alimentaire et sont bio-accumulés dans les organismes et entrant en compétition avec les éléments essentiels lors de l'absorption des nutriments provoquant ainsi des carences (Rajaie et al. 2006, Grant et al. 20110). La toxicité des ETM dans les écosystèmes dépend non seulement de la concentration totale en solution, mais aussi de leur spéciation qui influence leur biodisponibilité selon le pH et la texture du sol. La spéciation définit la forme chimique ou la phase porteuse, dans laquelle se trouve un élément (forme ionique, structure moléculaire, association physiques, support minéral ou organique) dans un milieu donnée. La spéciation est d'une grande importance pour évaluer la migration, la biodisponibilité et la toxicité des ETM. Le devenir des éléments traces est essentiellement commandé par des processus d'incorporation à l'interface solide/liquide.

Le minimum de temps de résidence dans le sol des ETM est de 75 ans dans un climat tempéré tandis que sous un climat tropical pluvieux, le lessivage de certains ETM est d'environ 40 ans seulement et sous les conditions lysimétriques, le temps de vie du Zn varie entre 70 et 510 ans, celui du Cd est entre 13 et 1100 ans, le Cu entre 310 et 1500 ans et le Pb entre 740-5900 ans (Kabata-Pendias 2011). D'après la compilation de différentes données (mentionné par Kabata-Pendias 2011) le temps de résidence de quelques ETM dans les sols sous un climat tempéré est estimé et présenté dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 Temps de résidence de quelques ETM dans les sols sous un climat tempéré (Kabata-Pendias 2011).

ETM	Temps de résidence dans le sol
Cd	75-380 ans
Zn, Pb, Cu, Ni, Ag et Se	1000-3000 ans
Hg	500-1000 ans

La Directive 1999/29 CE précise la liste des substances indésirables et la Limite Maximale (LM) des résidus des pesticides est régie par le règlement européen 396/2005 (amendements 149/2008, 839/2008 et 256/2009, etc.) (Keck 2002, Mathieu-Huart et al. 2014).

La Commission Européenne a identifié le Cd, Pb et Hg comme 'substances dangereuses prioritaires' dans les eaux souterraines (Décision 2455/2001/CE du conseil Européen modifiant la Directive Européenne sur l'Eau 2000/60/CE) (Redon 2009).

Il est complexe de déterminer le potentiel toxique de chaque ETM car il dépend de plusieurs facteurs. Néanmoins, il est possible d'identifier les ETM qui sont d'un grand intérêt toxicologique puisqu'ils sont ceux qui ont eu des effets graves sur la santé humaine. Citons par exemple, la maladie d'Itaï-itaï dûe à la contamination par le cadmium (Nogawa et al. 1983,

Chlopecka and Adriano 1997, Inaba et al. 2005), l'intoxication par le mercure à Minamata au Japon en 1950, à Niigata le long du fleuve Agano en 1960 (Harada et al. 1999, Ekino et al. 2007, Maruyama et al. 2012) et en Irak en 1970 (Bakir et al. 1980, Bensefa-colas et al. 2011) et la contamination de l'eau en arsenic au Bangladesh (Ahsan et al. 2006, McClintock et al. 2014).

L'impact toxique des ETM sur le développement des plantes et les communautés bactériennes qui influencent le développement des plantes par leur considérable contribution à la fertilité du sol a fait l'objet de plusieurs études (Kelly et al. 2003, Chaffei et al. 2004, Dong et al. 2005, Chihching et al. 2008, Gao et al. 2010, Pengthamkeerati et al. 2011). En effet, la longueur des tomates (*Lycopersicon esculentum*), leur masse, leur surface foliaire ainsi que l'activité de la nitrate réductase, la longueur et le volume de leurs racines ont diminué en présence du Cd dans le sol et dans la culture hydroponique (Chaffei et al. 2004, Dong et al. 2005). Dans un sol contaminé en cadmium et en plomb en présence d'une culture de *Solnum nigrum* L. et/ou *Zea mays* L. et sans culture, Gao et al. (2010) trouvent que le nombre de bactéries totales est de 45.10^5 CFU/g sol dans le traitement témoin qui était un sol non contaminé et non cultivé tandis que ce nombre variait entre 20.10^5 CFU/g sol et 30.10^5 CFU/g sol en absence de cultures et ce nombre augmentait en présence de cultures *Solnum nigrum* L. et/ou *Zea mays* L. d'où un rôle aux plantes à la diminution de la toxicité du Cd et du Pb sur le développement bactérien du sol.

I.2.8 Accumulation dans ETM selon les végétaux

L'absorption du Cd et du Zn dépend de l'espèce et de la variété végétale en plus des teneurs totales en ETM et du pH du sol (Page et al. 1987, Denaix 2007). Les plantes sont divisées en faiblement accumulatrices, accumulatrices et hyperaccumulatrices. Les plantes dénommées hyperaccumulatrices sont celles qui sont tolérantes et peuvent contenir dans leurs feuilles des concentrations supérieures à $100 \mu\text{g Cd/g}$, $1000 \mu\text{g/g}$ de Co, Cu, Ni et Pb et $10000 \mu\text{g/g}$ Mn et Zn (Van Der Ent et al. 2013).

L'accumulation des ETM dans les végétaux dépend de leur variation génotypique et augmente en allant des végétaux fruits (haricot vert) aux végétaux racines (radis) aux végétaux foliaires (laitue). Les plantes les plus faiblement accumulatrices de cadmium sont les légumineuses, les plantes moyennement accumulatrices sont les Graminées, les Liliacées, les Cucurbitacées et les Ombellifères et les plantes fortement accumulatrices sont les Chénopodiacées (épinard, betterave), les Crucifères (chou, navet, radis), les Composées (laitue) (Kuboi et al. 1986).

En plus du cadmium, les laitues sont accumulatrices du plomb, du zinc et du cuivre plus que les haricots (Alexander et al. 2006). Dans une même espèce, la concentration en cadmium varie entre les variétés (Denaix 2007).

Dans le même végétal, la répartition du métal diffère également. Le cadmium est accumulé dans les racines plus que dans la tige et plus que dans les grains du blé (Chen S. et al. 2007). Jiao et al. (2004) montrent que le cadmium est accumulé de façon minime dans les grains de blé et de lin par rapport aux racines, tiges et feuilles des céréales. Par contre, le zinc est accumulé en grande concentration dans les graines des céréales vis-à-vis des autres organes. Cette différence d'accumulation est expliquée par la différence de cotylédons entre les deux plantes et du fait que le Cd est un élément non essentiel alors que le Zn est un oligo-élément (Jiao et al. 2004). Le fer et le magnésium sont accumulés dans les vieilles feuilles et dans les gaines foliaires de l'orge tandis que le cuivre et le zinc sont distribués uniformément dans la plante (Kabata-Pendias 2011).

1.2.9 Fixation racinaire des ETM

Les plantes absorbent les métaux disponibles par les racines. Le prélèvement du Cd est plus important en présence de ligands inorganiques tels que le chlorure et le sulfate (McLaughlin et al. 1998, McLaughlin et al. 1999). La teneur en cadmium total a même augmenté jusqu'à cinq fois dans les sols fertilisés (Giuffrè et al. 1997). Le labour des sols aide à la dépollution de ces derniers en cadmium mais peut limiter la profondeur d'enracinement des cultures ce qui va augmenter l'absorption du cadmium se trouvant en grande quantité normalement dans les horizons superficiels du sol (Oliver et al. 1993).

L'absorption du cadmium est influencée par le zinc puisqu'ils se ressemblent chimiquement et appartiennent au même groupe. Le zinc peut soit augmenter l'absorption du cadmium par les cultures, soit diminuer cette absorption, soit n'avoir pas d'effet (Williams and David 1976, Grant and Bailey 1997, Gao et al. 2011, Grant 2011, Rojas-Cifuentes et al. 2012). La diminution d'absorption du Cd en présence de Zn peut être expliquée par la différence des rayons ioniques ($Zn^{2+} = 0,074$ nm, $Cd^{2+} = 0,097$ nm) et par la présence de protéines de Zn-transport commun dans la membrane plasmique d'où une compétition entre le Zn appliqué et le Cd vis-à-vis de leur absorption par les plantes (Köleli et al. 2004, Rojas-Cifuentes et al. 2012).

Les radis, les carottes et les laitues cultivés dans un sol argileux et à pH basique, accumulent plus du Cd que dans un sol sableux. Dans un sol à pH acide, les premières récoltes d'épinards accumulent du Cd plus que les deuxièmes récoltes, cette diminution du Cd est due à la

diminution de la disponibilité du Cd aux épinards causée par la fixation du Cd au sol et son enlèvement par le labour ou par le lessivage (He and Singh 1994).

La fertilisation à long terme rend le Cd immobile par son adsorption à la matière organique et aux ligands de phosphore d'où une diminution de la disponibilité de ce métal aux plantes et une persistance dans le sol limoneux sableux de pH 4,9 (Gray et al. 1999).

L'ajout d'apatite, de RP ou d'argile phosphatée à un sol contaminé en plomb peut immobiliser cet élément. Ainsi, le Pb en concentration plus importante dans le sol se fixera sur les sites d'adsorption du Cd et ce dernier sera plus disponible au blé (Lee et al. 2004, Chen S. et al. 2006).

Souvent, la distribution des ETM est déterminée par plusieurs facteurs tels que le facteur de bioaccumulation des ETM dans les parties aériennes des végétaux et le facteur de transfert des ETM des racines à la partie aérienne. Ci-dessous on décrit l'importance du facteur de transfert.

La santé humaine est en relation avec la qualité du sol et sa pollution qui peut refléter souvent la qualité des plantes et végétaux cultivés puisque le sol est connu comme le réservoir d'ETM dans lequel la plante puise. Ces ETM, comme cité auparavant, passent à la chaîne alimentaire et même à des concentrations faibles peuvent provoquer des risques à la santé humaine d'où une nécessité d'évaluer le transfert des ETM du sol aux plantes et des racines à la partie consommable ou aérienne. Pour évaluer le facteur de transfert des métaux, il faut considérer que la totalité des métaux présents est disponible pour la plante (Denaix 2007). Cependant, cette approche relève certaines ambiguïtés parce que la totalité des ETM ne reflète pas leur forme biodisponible, ce qui peut conduire à avoir des résultats aberrants. Ce facteur peut être affecté par le pH, le climat, la variété du végétal et son âge (Uwah et al. 2011). Il est calculé en divisant la concentration d'ETM trouvé dans la partie aérienne de la plante et celle dans les racines par l'équation suivante (Durand et al. 2015):

$$FT (\text{plant transfer factor}) = C_{\text{partie aérienne}} / C_{\text{racine}}$$

où ces deux concentrations sont fonction du poids sec. Khan et al. 2010 ont étudié le transfert de quelques ETM du sol aux plantes et ont trouvé que les facteurs de transfert du Cd dans le pourpier, Ni dans les grains de moutardes et la mauve, et le Pb dans la chicorée sont plus élevés que dans les autres végétaux (**Tableau 13**). Ainsi, le transfert du Cd et du Pb est plus important que celui du Zn, Cu et Ni vu les valeurs élevées des deux premiers éléments dans les espèces cultivées au Pakistan dans des sols sableux à pH $7,44 \pm 0,48$.

Tableau 13 Facteur de transfert de quelques ETM dans différentes espèces végétales.

	Cd	Pb	Zn	Cu	Ni
Epinard	1,26±0,99	0,57±0,45	0,21±0,13	0,26±0,19	0,23±0,09
Laitue	1,07±0,08	0,49±0,21	0,25±0,04	0,33±0,14	0,19±0,12
Moutarde	0,87±0,04	0,42±0,06	0,57±0,39	0,17±0,03	1,62±0,82
Chicoré	0,9±01	1,35±0,88	0,9±0,12	0,55±0,12	0,24±0,13
Pourpier	2,01±1,89	0,43±0,2	0,53±0,41	0,16±0,11	0,22±0,03
Mauve	1,19±1	0,42±0,17	0,15±0,1	0,25±0,12	1,62±1,2

Bien que ce facteur soit une indication sur l'idée de transfert des ETM du sol à la chaîne alimentaire et aux organismes vivants et malgré que de nombreuses études se réfèrent au facteur de transfert, cela reste insuffisant pour mettre en valeur l'efficacité de fixation et les mécanismes de fixation il est important de prendre en considération la notion de biodisponibilité.

I.3 Récapitulatif

Dans la partie précédente nous avons parlé des éléments traces métalliques, leur introduction par les engrais chimiques phosphatés, en quoi ils sont une source importante de nuisances sur l'environnement et la santé humaine. Nous avons également exposé les mécanismes de fixation de ces ETM dans les sols ainsi que les paramètres influençant la mobilité et la disponibilité de ces derniers. Tout cela était à l'échelle internationale où les pays ont des normes sur les quantités d'engrais utilisés, des études sur les quantités d'ETM ajoutés aux sols acides et européens via les dépôts atmosphériques et la fertilisation.

Mais les études sur l'impact des apports d'engrais sur les sols basiques sous un climat semi-aride ou l'investigation sur la quantité des éléments traces métalliques apportée par les engrais suite à leur utilisation dans le sol ne sont pas suffisantes même absentes. A l'échelle mondiale, ces travaux sont conduits pour établir des normes liées à la qualité des sols. C'est pour cette raison que notre projet de travail s'articule à caractériser ces engrais de leur composition jusqu'à leur application et leur transfert dans les sols alcalins sous un climat aride à semi-aride typique des pays du Moyen-Orient.

Cependant, le Liban en tant que pays du Moyen Orient, possède une particularité climatique Méditerranéenne influencée par un climat désertique régnant dans son intérieur et représentant une extension du climat Saharien le long de ses frontières Est. Ainsi, le sol est

aride à semi-aride avec une constitution alcaline riche en calcaire. Il est donc clair qu'une généralisation des données internationales ne peut nécessairement servir pour obtenir des réponses quant aux comportements des ETM dans les sols et venant des engrais.

I.4 Les sols libanais: Exemple typique de sols basiques sous un climat semi-aride

Le Liban a une superficie 10452 Km² avec une forme rectangulaire de longueur moyenne de 217 Km du nord au sud et une largeur de 80 Km au nord et 48 Km au sud. Géographiquement, il est placé sur les rivages Est de la mer Méditerranéenne entre les latitudes Nord 33° 03' 38'' et 34° 41' 35'' et longitude Est 35° 06' 22'. L'altitude moyenne des montagnes est de 400 m tandis que les hautes montagnes se dressent à 3088 m; d'où une diversité géographique et environnementale. Le climat au Liban est caractérisé par une période hivernale où les précipitations sont de 800 mm/an en moyenne le long de la côte et de 1400 mm/an dans les montagnes et une période sèche et humide en été qui dure 7 mois. La température annuelle moyenne est de 20°C sur la côte mais varie entre 13 et 27°C en hiver et en été respectivement, et entre 0 et 18°C sur les hautes altitudes. Le Liban manifeste, dans les régions de faibles pentes, comme celle de la vallée (pente < 8%), un pourcentage non négligeable de luvisols aussi appelés sols rouges ou *Terra Rossa* caractéristiques de la Méditerranée. Ces sols constituent environ 52% des zones à régime xérique d'humidité de sol et évoluent sur un soubassement calcaire (notamment karstique) alcalin (Darwish et al. 2004, Darwish et al. 2011). La majorité des sols libanais est formée par un dépôt de matériaux transporté par l'eau. On les nomme sol alluvial ou formé par le transport des matériaux par la gravité et dénommé sol colluvial (Ministry of Environment 2000a).

Les pratiques agricoles se déroulent dans différentes conditions climatiques, dans la zone côtière aussi bien que dans la vallée de la Béqaa, la plaine intérieure synclinale de hauteur de 1000 m, dessinant un couloir large de 5 à 20 Km séparant deux chaînes de montagnes (le Mont-Liban à l'Ouest et l'Anti-Liban) orientées parallèlement à la côte. La vallée de la Béqaa est considérée comme l'une des zones les plus importantes pour l'agriculture dans le pays malgré les conditions économiques difficiles dont souffrent les paysans et les conditions climatiques arides, avec une précipitation moyenne annuelle allant entre 250 et 750 mm (Geara et al. 2010), une température moyenne annuelle de 16°C mais variant entre 5 et 26°C en hiver en été respectivement (Comair 2011).

L'activité agronomique dans la vallée de la Béqaa reste un secteur dynamique et vital et ceci grâce à ces textures composées de 40-50% d'argile qui aide à retenir l'eau favorisant ainsi les cultures (Darwish et al. 2003). Elle représente 42% de la totalité de l'agriculture Libanaise et

50% des terres libanaises irriguées (Ministry of Environment 2000b, Darwish et al. 2011). La texture de la plaine centrale et du nord de la Béqaa est une texture moyenne-fine et on trouve une texture moyenne dans quelques régions de la vallée. Le type de sol varie avec l'emplacement et la région. Les principales classes de sol retrouvées dans la vallée sont les cambisols, les fluvisols et les vertisols (Darwish et al. 2008). On distingue les fluvisols eutriques alcalins, les cambisols vetriques rocheux ainsi que les vertisols argileux dans la Béqaa Central et les petric calcicols dans le nord-est de la Béqaa (Darwish et al. 2004). En effet, les fluvisols et les vertisols évoluent à partir de dépôts alluviaux et colluviaux quaternaires. La vallée de la Béqaa produit 57% des légumes, 37% des fruits et 62% des cultures industrielles (betteraves, pomme de terre, céréales et graines) du pays (Hajar et al. 2010).

Le point le plus élevé du Mont-Liban est formé par le soulèvement des montagnes avec des roches du Crétacé supérieur, et les roches du Jurassique moyen forment le sommet du mont Hermon de l'Anti-Liban (Walley 1997). Le pays est situé dans une zone tectonique active caractérisée par trois failles majeures (Yammouneh, Roum et Serghaya) et est traversée par des failles mineures (Stephan and Bou Jaoude 2010). La géologie du Liban allant du Jurassique (J) au Quaternaire caractérise les formations géologiques du pays et se composent essentiellement de roches calcaires karstiques Crétacé et du Tertiaire, de certains grès du Crétacé et du Quaternaire et avec présence de formations volcaniques dans le nord (Stephan and Bou Jaoude 2010). En outre, le Jurassique et le Crétacé moyen composent les principales sources des affleurements calcaires, tandis que les périodes tertiaires et quaternaires sont à l'origine des dépôts sédimentaires de la bande côtière et de la vallée de la Béqaa.

L'agriculture joue un rôle important dans l'économie du pays puisque les produits agricoles fournissent une partie des matières premières pour le secteur industriel. Un quart de la surface du pays est utilisé comme terres agricoles (**Tableau 14**) et entre 20 et 25% de la population travaille dans l'agriculture (Asmar 2011, AUB 2014).

Tableau 14 Terres utilisées ou exploitées en agriculture (Asmar 2011).

Type	Superficie (ha)
Zones utilisées pour l'Agriculture	214 380
Terres Arables	144 200
Terres Agricoles Irriguées	114 820
Terrain recouvert de serres	3 580
Terres en cultures annuelles	110 620
Terres sous cultures permanente	114 750
Terres jachères temporaires (1 à 5 ans)	11 382
Terres abandonnées (> 5 ans)	40 280
Terres non-agricoles	15 540
Terres non-productives	275 086
Superficie Totale	1 044 638

Plusieurs études ont été réalisées pour évaluer le sort des ETM dans les sols Libanais. Pour observer la solubilité et la mobilité du cadmium, du chrome et du nickel, les auteurs ont eu recours à la fertilisation phosphatée comme étant une source de ces ETM (Zhao et al. 2006, Nziguheba and Smolders 2008, Yamaguchi et al. 2009). Ces engrais ont pour but de diminuer le pH du sol en rendant le sol moins alcalin et en augmentant la solubilité de ces ETM. L'étude a montré une désorption du cadmium et du nickel dans les sols sableux de type inceptisol (sol riche en oxydes de fer en profondeur et riche en humus à la superficie) et les sols blancs de types rendosol (sol peu profond, très calcaire et un pH supérieur à 7,5) respectivement. Le nickel est mieux libéré aussi dans les sols limoneux. L'absorption du cadmium par les radis était importante dans le sol sableux inceptisol et le sol blanc rendosol (Ministry of Environment 2000a).

Dans ce contexte, le couplage de l'utilisation d'engrais et du compactage des sols n'est pas très connu dans la littérature alors que des questions sur la migration des ETM et la croissance des plantes pourront se poser dans le cas des effets combinés de compactage et de fertilisation phosphatée des sols. Ainsi, l'étude cherche à déterminer les effets du compactage sur la migration des ETM, sur la dynamique des populations de micro-organismes et des enzymes impliquées dans les processus métaboliques du sol et les effets de la fertilisation phosphatée sur la migration des ETM.

I.4.1 Choix de la plante: *Lactuca sativa*

L'absorption ou le transfert des ETM dépend de leur teneur et du pH du sol ainsi que de la nature de l'espèce végétale cultivée (Page et al. 1987). *Lactuca sativa* est d'origine méditerranéenne et l'histoire de sa domestication a débuté avant l'ère chrétienne. Elle a été cultivée par les Egyptiens, les Grecs et les Romains en premier lieu et fut introduite en France

au Moyen Age en 1389 à partir d'Avignon. Ensuite, sa culture s'est poursuivie en Europe du Nord tout d'abord, puis en Amérique du Nord, puis en Australie, suivant les migrations des européens dans le monde (Domingues et al. 2012). L'une des espèces de laitue les plus communes, *Lactuca sativa* L., est une plante diploïde, herbacée, annuelle, qui appartient à la famille des Astéracées répandue dans les régions tempérées. *L. sativa* est un légume typique dans la cuisine libanaise et fortement présent dans la région de la Béqaa. Karam et al. 2002 définissent une surface de 1500 ha/an cultivée de laitues dans la vallée de la Béqaa. Le marché d'exportation de ce légume a atteint 3.290.995\$ en 2011 (Index mundi). Grâce à leur sensibilité à la photopériode et à la température, les laitues peuvent avoir des morphologies aberrantes vis-à-vis leur feuilles. *L. sativa* ou laitues romaines sont des pommes hautes, contrairement aux autres types, et ont des feuilles lisses et allongées.

La laitue montre différents aspects en fonction du stade végétatif et la variété. Selon le type de sol, la racine pivotante est plus ou moins ramifiée et est généralement concentrée dans les 30 premiers centimètres du sol. Au stade de la pommaison, la tige centrale de *L. sativa* est courte (2 à 5 cm) et contient entre 45 et 50 feuilles en rosette. Après la pommaison, la tige se développe et se ramifie en formant de petites fleurs composées jaunes et bisexuées. Enfin, il y a formation du fruit nommé akène. La plante de laitue donne généralement entre 0,5 à 6 g de graines selon les conditions de culture où 1 g contient 600 à 1000 graines. Certaines plantes produisent 10 grammes en été. L'eau est le constituant principal de la laitue, elle contient environ 95% d'eau dans sa partie consommable mais aussi 1,5% de fibres alimentaires, 0,9% de sucres, des minéraux, vitamines, des acides organiques, des nitrates, etc. La composition diffère entre les variétés selon les conditions de culture, le type de laitue et la saison. La valeur nutritive et la valeur calorique sont limitées à 36 kJ et 44 kJ respectivement pour 100 g de laitues.

Le cycle complet de la laitue du semis de la graine à la récolte est constitué de plusieurs phases durant l'année: la germination et la levée, la croissance de la plante, la pommaison, la montaison, la floraison et enfin la maturation des graines. Dans la nature, le cycle est complet, les rosettes de laitues se rencontrent après la levée, d'octobre à mars et les plantes montent au printemps, fleurissent au début de l'été et se ressèment. Tandis qu'en culture, le cycle est incomplet et les producteurs récoltent les laitues après la pommaison. Le cycle dure environ 45 jours en culture d'été à 6 mois en culture d'hiver de plein champ. La montaison peut avoir lieu sans passer par le stade de pommaison, lors de la production grainière. Mais la floraison nécessite des jours longs avec un éclairage de 9 à 16 heures de lumière.

Pour chaque stade de développement, les températures optimales varient. Les graines doivent être conservées à une température comprise entre 3 et 25°C et la température optimale pour la germination varie entre 18 et 25°C. La graine germée ne peut se développer que si les conditions du milieu sont satisfaites telles que la présence d'eau, d'éléments nutritifs, d'oxygène et de gaz carbonique, la lumière et les températures convenables. Un sol trop acide ($\text{pH} < 6$), une température de sol trop basse, un déséquilibre température/lumière trop élevé, une asphyxie ou une trop forte salinité sont des facteurs défavorables à la culture des laitues. La température idéale pour la pommaison est de 20°C. Il est important d'avoir un équilibre entre la température ambiante et celle du sol afin que les développements foliaires et racinaires soient équilibrés également (Thicoipé 1997).

Dans la vallée de la Béqaa, ni la demande en fertilisants phosphatés par rapport aux aires cultivées ni la culture des laitues est négligeable. L'agriculture libanaise utilise 32000 tonnes d'engrais en plus de 2500 tonnes de pesticides par an d'où une dégradation du sol (Ministry of Environment 2000a). Farajalla et al. (2010) définit une consommation de 1860 Kg engrais/ ha/ an et Karam et al. 2002 mentionne une surface de 1500 ha est cultivée de *Lactuca sativa* par an.

II Chapitre II: Matériels et Méthodes

II.1 Collecte des engrais chimiques phosphatés

II.1.1 Procédure de collecte

D'après le ministère de l'agriculture Libanais, on trouve sur le marché Libanais 250 genres d'engrais chimiques de différentes origines qui sont rapportés dans les documents du ministère en 2012. Un nombre de 44 échantillons d'engrais chimiques phosphatés les plus commercialisés ont été collectés, du long de la zone côtière et de la région de la Béqaa caractérisées par des activités agricoles intensives. L'objectif de la collecte est de confectionner une gamme d'échantillons d'engrais contenant des quantités variables de phosphore homologué à l'azote et au potassium ayant différentes origines. Tous les échantillons étaient des échantillons solides de 500 g excepté deux qui sont liquides. A partir des informations récupérées auprès du producteur, on a réparti les échantillons en quatre familles: les Phosphates de Potassium (2 échantillons), les Phosphates d'Urée (2 échantillons), les Superphosphates (2 échantillons) et les N.P.K (Azote-Phosphate-Potassium) (38 échantillons) (**Tableau 15**).

Tableau 15 Caractéristiques rapportés par les producteurs des 44 engrais échantillons collectés.

	Nom commercial	Formule Générale (N-P-K-ET*) %	Pays d'origine
1	Rosier	12-7-17 + 2 MgO	Belgique
2	Goldenfert Blu	11-12-17	Italie
3	Basacote Plus 6M	16-8-12 + 2 MgO	Allemagne
4	Niger	20-20-20	Italie
5	Prestige	20-20-20 + ET (0,01 Cu + 0,1 Fe + 0,03 Mn + 0,04 Zn et 0,005 B)	Jordanie
6	Plantfeed	30-10-10 + ET (Cu + Fe + Mn + Zn et B)	Jordanie
7	Floranid Turf	20-5-8 + 2 MgO	Allemagne
8	Nitrophoska blue special	12-12-17 + 2 MgO + ET (Fe + Mn + 0,01 Zn + 0,02 B et Mo)	Allemagne
9	Asmida	17-17-17	Russie
10	NPK Prilled	16-16-16	Russie
11	Yara	15-15-15 + 5 SO ₃	Norvège
12	Orto Frutta	12-12-17 + 2 MgO + 22 SO ₃	Italie
13	Normal Superphosphate	18-20% P ₂ O ₅	Liban
14	Orto Frutta	15-15-15 + 10 SO ₃	Italie
15	Blau Concime CE	12-12-17 + 2 MgO + 20 SO ₃	Italie
16	Codaphos K	0-42-28	Espagne
17	Sangral	20-20-20	Belgique
18	Fertichem	28-14-14 + ET (0,006 Cu + 0,06 Fe + 0,04 Mn + 0,04 Zn + 0,01 B et 0,001 Mo)	Turquie
19	Fertichem	13-40-13 + ET (0,006 Cu + 0,06 Fe + 0,04 Mn + 0,04 Zn + 0,01 B et 0,001 Mo)	Turquie

20	Fertichem	20-20-20 + ET (0,006 Cu + 0,06 Fe + 0,04 Mn + 0,04 Zn + 0,01 B et 0,001 Mo)	Turquie
21	Fertichem	11-9-36 + ET (0,006 Cu + 0,06 Fe + 0,04 Mn + 0,04 Zn + 0,01 B et 0,001 Mo)	Turquie
22	Plantafol LQ	8-8,5-6	Italie
23	Vilmorin Coup de fouet	7-6-7	France
24	Trainer MGR	20-5-10 + 2 MgO + 1 Fe	Italie
25	Triple superphosphate	46-48% P ₂ O ₅	Liban
26	Frarimpex Leafdrip	28-14-14 + ET (0,01 Fe + 0,01 Mn et 0,01 Zn)	France
27	Unidrop	20-20-20	Italie
28	Miller	20-20-20	Etats-Unis
29	Miller	30-10-10	Etats-Unis
30	Valagro NPK	4-2-41	Italie
31	Miller	12-48-8	Etats-Unis
32	NPK	15-15-15 + 15 SO ₃	Belgique
33	Libro	20-20-20 + ET (0,0056 Cu + 0,0049 Fe, 0,008 Mn + 0,0055 Zn + 0,003 B et 0,004 Mo)	Arabie Saoudite
34	NPK	15-15-15	Ukraine
35	Basfoliar	25-10-17	Allemagne
36	Tara grow	20-20-20 + ET	-
37	Deltaspray	20-20-20	Norvège
38	Hortipray	0-52-34	Belgique
39	VanIperen international	1-12-17 + 2 MgO + 20 SO ₃	Hollande
40	Sangral	17,5-44-0	Belgique
41	Idropiu 111	20-20-20	Italie
42	Gro Gran	15-15-15 + 2 MgO + 15 SO ₃ + 5 CaO + 1 Zn	Belgique
43	Greenphos urea phosphate	17-44-0	Jordanie
44	Nutrichem	20-20-20 + ET	Belgique

*Eléments Traces

II.1.2 Caractérisation des engrais chimiques phosphatés

En se référant au **Tableau 15**, dans 6 échantillons sur 44, la présence de SO₃ a été mentionnée et dans 14 échantillons la présence d'ETM. Ainsi, la première étape dans la procédure expérimentale consistait à déterminer les concentrations en ETM dans les engrais et à identifier les relations avec les composants majeurs des engrais pour enfin estimer les apports en ETM par les engrais dans les sols. Dans cette partie, une caractérisation structurale, minéralogique et physico-chimique des échantillons a été lancée selon la démarche expérimentale ci-dessous (**Figure 16**):

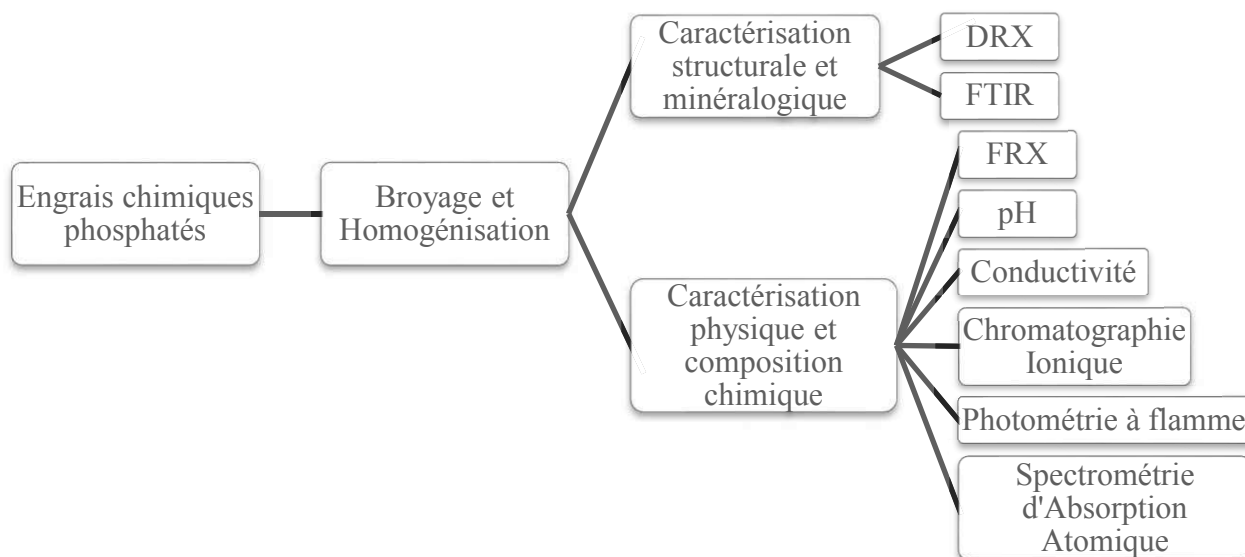


Figure 16 Démarche expérimentale pour la caractérisation des engrais phosphatés

II.1.3 Méthodes de caractérisation

Les méthodes décrites dans cette partie sont des méthodes qui fournissent des informations sur la composition minéralogique des engrais, leurs caractéristiques structurales et leurs teneurs en éléments traces métalliques afin de mettre en évidence les liens entre les ETM et les phases minérales.

Les échantillons d'engrais phosphatés solides sont broyés et homogénéisés dans un mortier en agate et conservés à la température ambiante dans des flacons de 100 mL en polyéthylène dans un dessiccateur pour empêcher l'hydratation des échantillons. Deux grandes voies méthodologiques ont été suivies pour caractériser les échantillons: la voie sèche pour faire les analyses par DRX, FTIR et FRX et la voie humide pour faire les analyses du pH, Conductivité, Spectroscopie d'Absorption Atomique et Chromatographie Ionique.

II.1.3.1 Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X a été utilisée pour identifier les phases minérales cristallisées présentes dans les engrais et mettre en évidence la présence de potentielles phases porteuses de métaux et métalloïdes.

Les échantillons préalablement homogénéisés pour avoir un bon rapport signal/bruit en évitant les fluctuations de l'intensité, sont pressés dans un porte échantillon en PVC de 2,5 cm diamètre et 2 mm d'épaisseur. Les analyses sont effectuées par le diffractomètre Bragg-Brentano ($\theta:2\theta$)

de marque D8 Bruker équipé d'un tube à rayons X à anticathode en cuivre de longueur d'onde $\lambda_{Cu}=0,154060$ nm, 40 kV, 40 mA, de fente d'ouverture 1mm et un slit de divergence de 1mm d'ouverture. Rappelons que l'instrument est préalablement calibré en utilisant un échantillon de référence de Corindon.

Une source monochromatique couplée à un filtre en Nickel K_{β} est utilisée dans cette méthode. Les diffractogrammes DRX ont été collectés sur un intervalle angulaire compris entre 3° et 80° (2θ) avec un temps d'acquisition d'une seconde par point et avec une résolution de $0,02^{\circ}$. Ainsi, l'enregistrement du signal fournit le diagramme de diffraction de l'échantillon irradié (Chauhan et al., 2013, Renteria-Villalobos et al., 2010). Les phases cristallines de nos échantillons ont été déterminées par le programme EVA couplé à la librairie (Powder Diffraction files) des données des poudres de diffraction ICDD (Interactive Center for Diffraction Data) pour remonter jusqu'à la structure cristallographique de l'échantillon.

Un faisceau de rayons X incident de longueur d'onde λ (comprise entre $0,1 \text{ \AA}$ (rayons X durs) et 50 \AA (rayons X mous)) ne sera réfléchi par une famille de plans d'indice de Miller (h, k, l) que dans la mesure où il rencontre ces plans sous un certain angle appelé angle de Bragg. Les angles de Bragg sont ainsi liés à la longueur d'onde des rayons X utilisés et aux distances inter-réticulaires de la famille de plans (h, k, l) qui diffractent ces rayons tel que:

$$\sin\theta = n\lambda/2d_{hkl}$$

avec λ : la longueur d'onde du faisceau de rayons X

d : la distance inter-réticulaire

θ : l'angle d'incidence des rayons X

n : l'ordre de diffraction

II.1.3.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Cette technique a été utilisée pour identifier les principaux groupements fonctionnels tels que les groupements P-O, S-O, N-H, N-O et H-O dans les échantillons afin de mettre en évidence les différences structurales et leurs abondances relatives dans les engrais phosphatés. L'échantillon en poudre est dilué avec du bromure de potassium (KBr, $\geq 99\%$, FT-IR grade, Sigma-Aldrich) jusqu'à 1% (m/m), comprimé dans un cylindre en acier inoxydable de diamètre $0,7$ cm afin d'obtenir un échantillon en pastille qui sera placé devant le faisceau IR. L'enregistrement des spectres est en mode de transmission un nombre d'onde compris entre $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ avec une résolution de scan de 4 cm^{-1} (Bernier et al. 2013). L'instrument utilisé est le FTIR 6300 JASCO.

Une onde infrarouge (IR) traverse l'échantillon, une fraction est absorbée par l'échantillon alors qu'une autre est transmise. Ces fractions sont fonction de l'état de vibration et de rotation des composés de l'échantillon. Une radiation émise par la source est absorbée lorsque la fréquence de cette onde concourt avec la vibration de la liaison moléculaire électriquement polarisée.

II.1.3.3 Spectrométrie de fluorescence X (FRX)

La FRX a été utilisée pour donner l'analyse élémentaire des échantillons d'engrais. Une masse de 1 à 2 g d'échantillon broyé est comprimée dans une cuve cylindrique en téflon de diamètre interne 2 cm et de 1 cm de profondeur. Avant toute analyse par FRX, un standard en inox de 70% de Fe, 15% de Cr et 15% de Ni est utilisé. Une incertitude relative < 5% est tolérée. L'appareil utilisé est un canon Thermo Scientific Niton XL2 X-Ray avec une source de rayons X et une anode en argent de 45 kV et 80 μ A maximum. L'appareil est étalonné à l'avance quand le porte-échantillon est vide et ensuite les signaux du blanc sont soustraits des signaux cumulés des échantillons analysés. Les valeurs sont données en pourcentage relatif. Les spectres pour tous les échantillons sont cumulés pendant 45 secondes. Ainsi, on remonte à la composition élémentaire de chaque échantillon puisque chaque élément chimique dans l'échantillon est caractérisé par des orbitales électroniques d'une énergie connue et chaque photon fluorescent généré lors des transitions possède une énergie et une longueur d'onde spécifique. En effet, cette méthode d'analyse chimique repose sur les propriétés physiques de la matière puisque la matière bombardée avec des rayons X va émettre de l'énergie sous forme de rayons X (**Figure 17**).

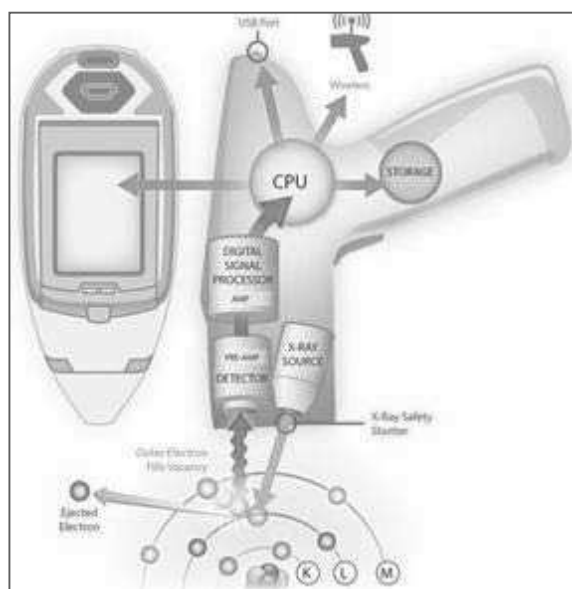


Figure 17 Représentation schématique de la fluorescence X.

Ainsi, les atomes d'un matériau sont ionisés quand ce dernier subit un bombardement de rayons de forte énergie comme les rayons X, gamma et faisceau d'ions accélérés. Les électrons sont éjectés des couches électroniques et les atomes du matériau sont dans un état excité d'où une instabilité de la structure électronique des atomes. La désexcitation est le processus inverse et l'électron excité passe d'un niveau d'énergie élevée à un niveau plus faible. Cette transition électronique provoque l'émission d'un photon X qui s'il va sortir de l'atome, on parlera de la fluorescence X qui est une réémission de rayonnement moins énergétique. L'énergie du photon X émis est égale à la différence d'énergie des deux orbitales de transfert lors de la désexcitation.

II.1.3.4 *pH et conductivité*

Des suspensions-solutions de 1 g/L des engrais chimiques sont préparées avec de l'eau distillée (Thawornchaisit and Polprasert 2009). A l'aide d'un agitateur magnétique, les suspensions-solutions ont été agitées durant 2 heures afin de mesurer leurs pH et leurs conductivités. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Adwa AD 1000 pH/mV & Temp meter) pré-étalonné par les solutions tampons de pH 4, 7 et 10. La conductivité est exprimée en $\mu\text{S}/\text{cm}$ et mesurée par un conductimètre WTW Cond 330i couplé à une électrode tetraCon 325 (Weilhein). L'étalonnage est réalisé avec une solution étalon de KCl 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à 25°C.

II.1.3.5 *Chromatographie ionique et photométrie à flamme*

Les solutions préparées pour la mesure du pH et de la conductivité sont filtrées à l'aide d'un filtre seringue en nylon de 0,45 μm de porosité (Sartorius). Les résidus des papiers filtres sont récupérés pour subir les analyses par DRX. Les filtrats obtenus subissent l'analyse par chromatographie ionique et par photométrie à flamme.

La première analyse consiste à mesurer les anions majeurs dissous (PO_4^{3-} , Cl^- , SO_4^{2-} et NO_3^-) par la chromatographie ionique Shimadzu Shim-pack IC-A3 couplée au détecteur CDD-10AVP qui permet de séparer les anions, lorsqu'ils traversent la colonne, en fonction de leur affinité avec les sites échangeurs de la colonne. La chromatographie ionique est équipée d'une colonne échangeuse d'anions (Shim-pack IC-A3 (S) de diamètre interne 2 mm et de longueur 150 mm). Le principe consiste à injecter l'échantillon (volume d'injection = 20 μL) à l'intérieur d'un flux éluant constitué par un mélange d'acide phydroxybenzoïque (8 mM), du Bis-Tris (3,2 mM) et d'acide borique (50 mM) avec un débit de 0,2 mL/min. Un détecteur conductimétrique associé à un poste d'acquisition permet d'enregistrer les chromatogrammes présentant les pics d'éluion à différents temps de rétention spécifiques d'un anion donné.

Au début de chaque série d'analyse, un étalonnage est réalisé. Quatre étalons formés chacun de mélange de Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , et NO_3^- sont préparés. La concentration de Cl^- dans les 4 étalons est de 0,1; 0,2; 0,4 et 10 mg/L respectivement, celle du SO_4^{2-} est 0,4; 0,8; 1,6 et 40 mg/L. Pour PO_4^{3-} et NO_3^- , leurs concentrations dans les étalons sont identiques. Elles sont 0,3; 0,6; 1,2 et 30 mg/L pour l'étalon 1, 2, 3 et 4 respectivement.

La deuxième analyse est la détermination des concentrations de K^+ et Na^+ à l'aide du photomètre à flamme AFP 100 (Biotech engineering Management Co. Ltd). A chaque série d'analyse, une gamme de concentrations étalons (5, 10 et 15 mg/L) a été préparée pour K et Na à partir de deux solutions mères de 100 mg/L de Na et de K (99%, Sigma-Aldrich). Un étalon de contrôle a été passé systématiquement toutes les 10 analyses. La limite de quantification de cette méthode est de 0,1 mg/L pour K^+ et Na^+ .

II.1.3.6 Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA)

La méthode utilisée est basée sur la norme ISO 11466 : 1995 fixée pour l'extraction des éléments traces solubles dans l'eau régale. La méthode consiste en une minéralisation complète à l'eau régale des échantillons séchés sous reflux continu.

Les échantillons broyés sont séchés puis une masse de 3 g (± 2 mg) d'échantillon est incubée dans un erlenmeyer de 250 mL avec 21 mL HCl (12 M, Merck) et 7 mL HNO_3 (14 M, Merck) durant 16 heures à température ambiante. Chaque digestion d'échantillon est répétée trois fois. Le mélange est chauffé sous reflux à 50°C pendant 30 minutes puis la température de chauffage est élevée à 120°C et maintenue durant 2 heures en s'assurant que la zone de condensation est inférieure à 1/3 de la longueur du condensateur pour permettre le refroidissement. Sur le mélange refroidi on ajoute 10 mL HNO_3 dilué (0,5 M) et on filtre sur un filtre PTFE de 0,45 μm (Millipore). Le volume du filtrat est ajusté jusqu'à 50 mL en ajoutant de l'acide nitrique dilué (0,5 M). Le mélange acide est conservé à 4°C jusqu'au moment de l'analyse du Cd à une longueur d'onde de 228,8 nm, Zn à 213,9 nm, Pb à 283,3 nm, Fe à 248,3 nm, Cu à 324,7 nm et Ca à 422,7 nm par la Spectroscopie d'Absorption Atomique (Rayleigh WFX-210 équipé d'un échantillonneur automatique WF-10A).

L'instrument est étalonné en préparant des solutions standards de chaque élément à analyser. Les blancs ont été préparés et digérés selon le protocole utilisé pour les échantillons d'engrais phosphatés avec HCl et HNO_3 (3:1). Chaque blanc a été répété trois fois et mesuré systématiquement après chaque série de 9 échantillons. Les étalonnages (5 étalons pour chaque élément) sont réalisés au début d'une série d'analyses et au bout de chaque série de 18

échantillons un étalon de contrôle est mesuré. Les étalons de Cd sont 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 et 1 mg/L, ceux du Zn 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 et 0,5 mg/L, et ceux du Pb 2, 3, 4, 6, 8 et 10 mg/L. Pour Fe et Ca, les étalons sont identiques, (1, 2, 3, 4 et 5 mg/L) et enfin pour Cu, les étalons sont 0,5; 1; 1,5; 2 et 2,5 mg/L. La limite de quantification de chaque ETM est égale à 0,1 µg/L, 6,7 µg/L, 1,6 µg/L, 20 µg/L, 3,3 µg/L et 1,6 µg/L pour le Cd, Zn, Pb, Fe, Ca et Cu respectivement. Le Cd, Pb et Cu ont été analysés en mode four et Zn, Fe et Ca en mode flamme. Un échantillon de référence pour les engrais (BCR-032, Sigma-Aldrich: poudre de roche phosphatée marocaine) et un autre pour le sol (CRM-051-050, Sigma-Aldrich: Métaux trace-argile 2) ont été utilisés pour s'assurer de la qualité des dosages.

La technique de spectroscopie d'Absorption Atomique permet de quantifier les éléments traces métalliques dans des gammes de l'ordre du µg/L en mode four graphite ou mg/L en mode flamme. La solution à analyser est aspirée par un atomiseur/nébuliseur vers le four ou la flamme qui vont pulvériser l'échantillon et le rendre à l'état atomique. Une lampe à cathode creuse qui est spécifique de l'élément d'intérêt va produire des radiations de longueur d'onde caractéristiques des atomes à doser. Le monochromateur fonctionne comme un isolateur de photons de longueurs d'ondes indésirables ou comme sélecteur de longueur d'onde. La radiation est ensuite absorbée par les atomes non excités sur le trajet de la lumière et est détecté par un détecteur et un photomultiplicateur qui augmente l'intensité de la détection.

II.2 Migration des métaux dans le sol

Pour observer la migration et le transfert des ETM dans un sol libanais représentatif, un sol non fertilisé a été choisi dans la vallée de Béqaa. Le choix de ce site dépendait de son éloignement de toutes activités anthropiques telles que les pratiques agricoles et les activités industrielles, donc un sol typique situé à l'ouest de la vallée. Le sol échantillonné (S1), localisé dans la région d'Ammik (Béqaa Ouest), est du type cambisol eutrique. Une masse approximative de 750 Kg de sol a été prélevée à une profondeur de 0-50 cm. Ce sol non fertilisé permet l'étude de la mobilité des ETM après l'addition des engrais chimiques phosphatés et du chlorure de cadmium dans le système de colonne de migration cultivé en *Lactuca sativa* mis en place.

Un autre échantillon de sol non fertilisé (S2) a été collecté dans la même région d'Ammik entre 33° 43' 43.5''N, 35° 46' 32.8''E et 903 m d'altitude pour voir son évolution en profondeur et suivre les ETM dans le profil afin de prévoir le devenir des ETM. L'échantillon a été prélevé à l'aide d'un carottier motorisé Atlas Copco model COBRATT (GENERATION 2010). Le carottage a été réalisé jusqu'à une profondeur de 80 cm. L'échantillon carotté a été découpé sur place en dix niveaux d'épaisseur variable allant de la surface au fond (0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm, 15-20 cm, 20-25 cm, 25-30 cm, 30-40 cm, 40-50 cm, 50-60 cm et 60-80 cm). Chaque fraction a été mise dans un sac en polyéthylène jusqu'à l'arrivée au laboratoire et conservée dans le réfrigérateur à 4°C en attendant d'effectuer les analyses. Ce type de fractionnement de la carotte est réalisé pour suivre la mobilité des ETM dans le profil du sol étant donné qu'il retrace la mémoire des dépôts dans cette région. La distance séparant les deux sites était d'environ 1000 m (**Figure 18**).

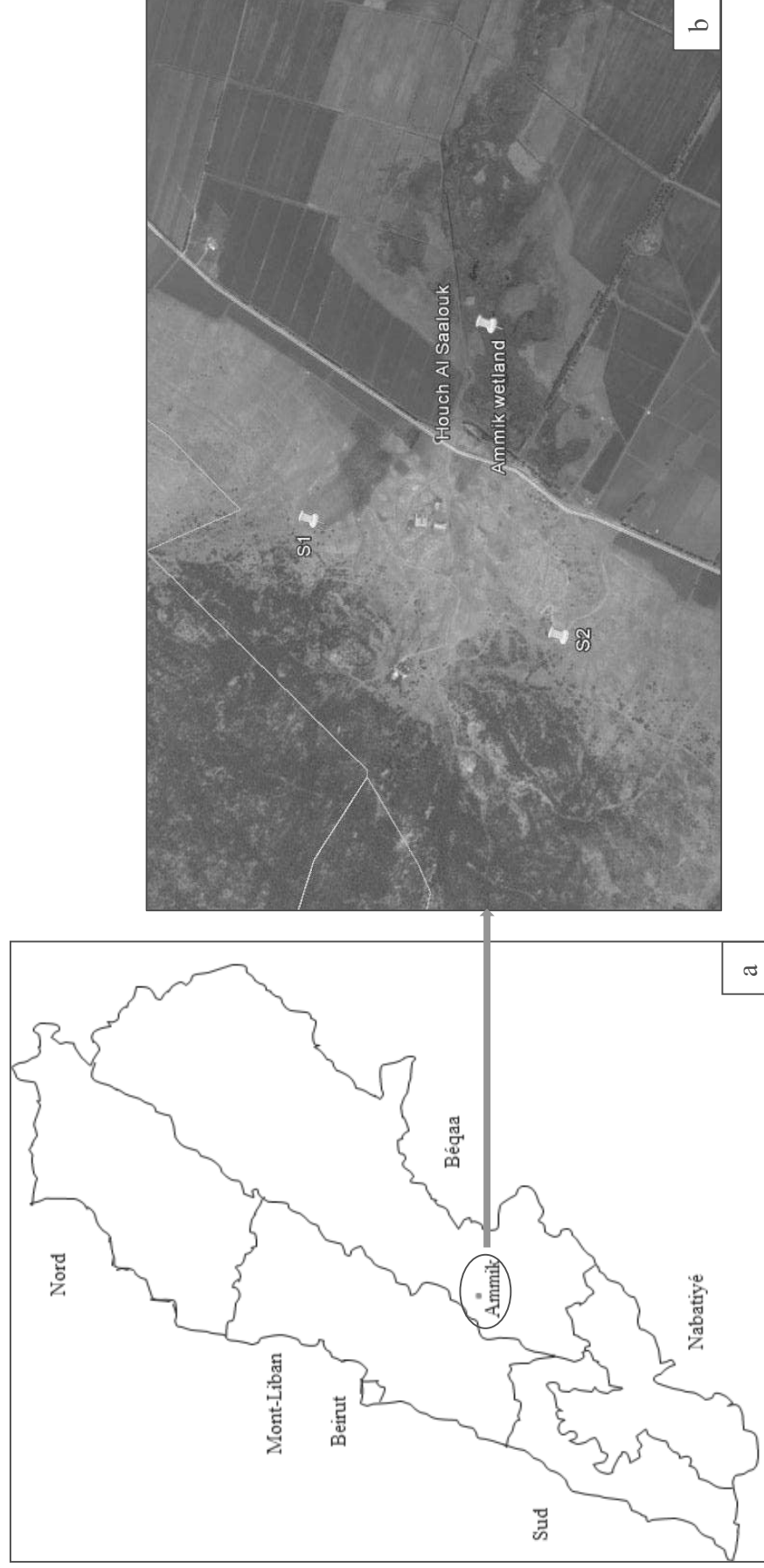


Figure 18 Site d'échantillonnage d'Ammik: a) Localisation du site; b) photo aérienne (source Google Earth) du sol S1 et S2.

II.2.1 Concept des colonnes

Les colonnes de migration de sol sont utilisées en tant que modèle pour simuler la migration et le lessivage des ETM dans le sol (Giordano and Mortvedt 1976, Emmerich et al. 1982, Sayyad et al. 2010). Sayyad et al. (2010), ont utilisé des colonnes de sol à pH 7,7-7,9 et une teneur en argile entre 385 et 405 g/Kg, de diamètre 22,5 cm et de hauteur 50 cm pour étudier le transport du cadmium, cuivre, plomb et zinc dans un sol calcaire cultivé de blé et de carthame. Le choix de ces deux types de végétaux dans ce sol permet d'observer le transfert de ces ETM sous différents systèmes racinaires. Camobreco et al. (1996), ont étudié le déplacement des ETM (Cd, Zn, Cu et Pb) ajoutés aux colonnes, de diamètre 20 cm et de hauteur 35 cm et qui sont remplies de sol homogène et non homogène. Les deux sols ont été échantillonnés sur le même site mais la procédure de remplissage dans les colonnes est différente pour obtenir un sol homogène dépourvu d'agrégats et un sol non homogène contenant des vers de terre et des canaux radiculaires. Cependant ces travaux ont évoqué la problématique de migration des ETM dans les sols acides sans beaucoup faire attention aux ETM dans les sols basiques sous un climat aride et tempéré.

Dans cette partie expérimentale, nous avons utilisé le modèle de colonne remplie de sol pour identifier la migration des métaux dans le sol. L'eau d'irrigation sous drainage gravitaire est récupérée à l'extrémité inférieure de chaque colonne dans un récipient en plastique. Les colonnes utilisées sont en polychlorure de vinyle (PVC) comme celles utilisées par Li and Wong (2010) dans leur investigation sur le rôle des bactéries sur la mobilité et la spéciation du Cd, Cu, Pb, Zn et de l'As. Elles ont un diamètre de 19,5 cm et une hauteur de 45 cm et sont positionnées verticalement sur un support non métallique (en bois) pour éviter toute source de contamination (**Figure 19**). La partie inférieure des colonnes est fermée par une toile en plastique à perforations carrées de 2 mm de côté pour permettre la percolation de l'eau d'irrigation. Les infiltrats de l'eau d'irrigation ont été collectés dans des conteneurs en polyéthylène, de contenance 1 L, hermétiquement fermés par du téflon pour éviter tout risque de contamination et de contact avec l'atmosphère.

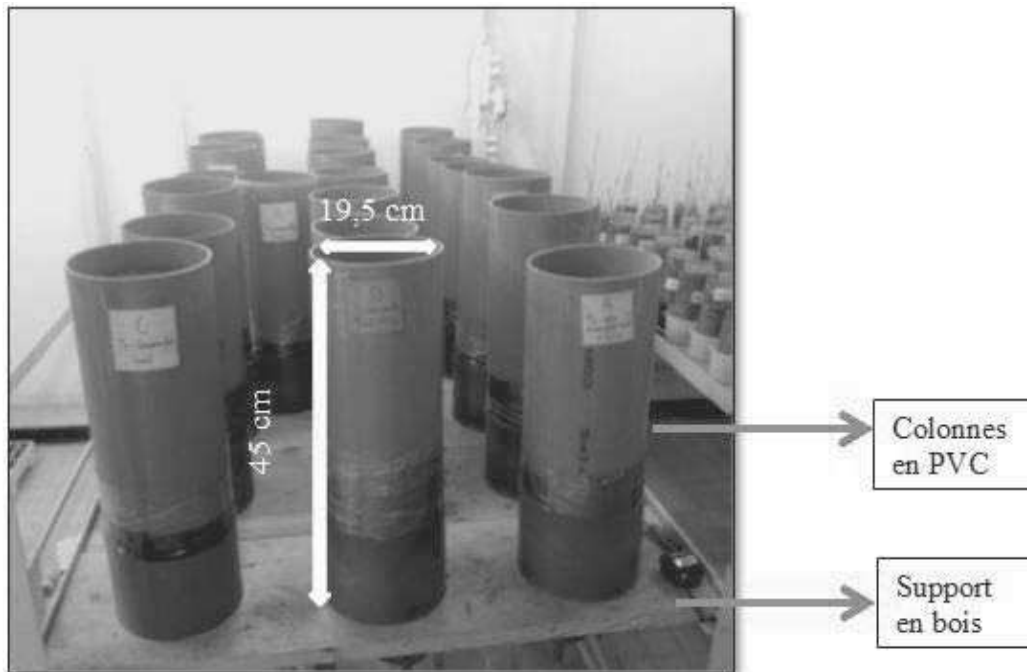


Figure 19 Système des colonnes de migration.

II.2.2 Préparation du sol de remplissage des colonnes

La migration est observée sous deux niveaux de densités: une densité faible de $1,2 \text{ g/cm}^3$ et une densité moyenne de $1,4 \text{ g/cm}^3$. Tout d'abord le sol échantillonné est séché à température ambiante et tamisé à 7 mm pour enlever les particules grossières (**Figure 20**). Pour obtenir les densités voulues dans les colonnes de sol, les couches de sol ont été superposées selon la méthode de Jusoff 1991. Les colonnes étaient remplies jusqu'à la hauteur de 40 cm d'où un volume total de la colonne de $11,939 \text{ dm}^3$.

Selon l'équation $M = V \times D$, où M est la masse de sol (g), V son volume (cm^3) et D la densité convenable (g/cm^3); ainsi, la masse de sol correspondant aux différents niveaux de compaction est déterminée.

Pour obtenir une densité de $1,4 \text{ g/cm}^3$ dans la colonne, il a fallu superposer 3 couches de sol de 10 cm de hauteur et de masse 4,178 Kg chacune puis 2 couches de sol de 5 cm et de masse 2,089 Kg chacune. Pour obtenir la densité $1,2 \text{ g/cm}^3$ dans la colonne, 3 couches de sol de 10 cm de hauteur et de masse 3,582 Kg sont superposées puis 2 couches de sol de 5 cm et de masse 1,791 Kg. Selon la méthode décrite par Son et al. (2011), sur chaque couche de sol, une pression unidirectionnelle a été appliquée à l'aide d'une tige cylindrique de même diamètre que la colonne (Son et al. 2011). A la fin de la compaction, les colonnes de sol contenaient une masse de 14,33 Kg de sol pour les colonnes non compactées et 16,71 Kg pour les colonnes

compactées. La densité du sol égale à $1,2 \text{ g/cm}^3$ est la densité représentative d'un sol alcalin. La densité $1,4 \text{ g/cm}^3$ a été choisi pour évaluer l'effet de la compaction sur le développement de la plante comme, selon l'USDA, une densité égale à $1,39 \text{ g/cm}^3$ affecte le développement des racines.

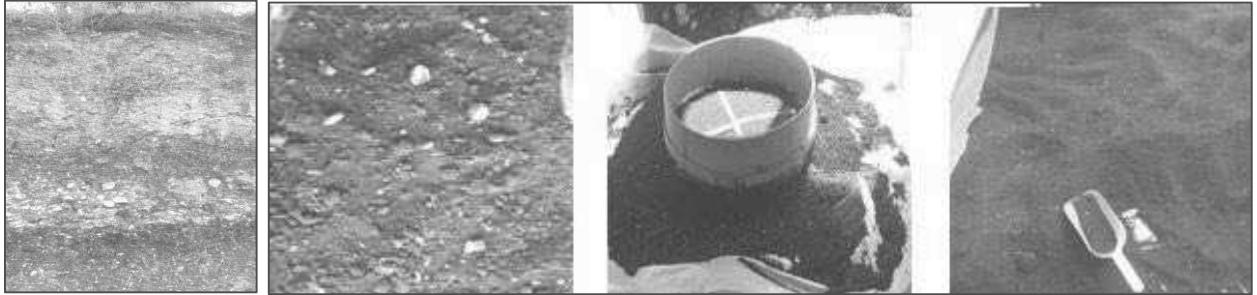


Figure 20 Remplissage des colonnes de sol.

II.2.3 Choix de l'engrais chimique phosphaté et du contaminant métallique

Une fois effectuées les compactations correspondant aux densités de sol prévues, le choix de l'engrais phosphaté et du contaminant métallique a été défini.

L'engrais phosphaté utilisé est sous forme de poudre blanche de superphosphate simple (18-20% P_2O_5) est assuré par 'Lebanese Chemical Company-LCC' et est représenté par l'échantillon numéro 13 du **Tableau 15**. Ces caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 16**.

Tableau 16 Caractéristiques du superphosphate simple utilisé.

P_2O_5 (%)	Cd	Pb	Cu	Zn	Fe
	mg/Kg				
$18,5 \pm 0,1$	$5,69 \pm 0,05$	$9,23 \pm 0,11$	$7,81 \pm 0,01$	$92,3 \pm 0,3$	$840,1 \pm 0,10$

Le cadmium a été choisi parmi les ETM pour suivre ses effets et son comportement dans les colonnes de sols. Le cadmium utilisé est sous forme de poudre de chlorure de cadmium monohydraté ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 99,99%; Sigma-Aldrich).

Le phosphate et le Cd ont été ajoutés et mélangés dans la couche superficielle du sol (0-5 cm) des colonnes de migration de sorte à avoir deux concentrations différentes: 0 et 109 mg P.kg^{-1} sol et 0 et $83,8 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$. L'engrais, le cadmium et le sol ont été mélangés et homogénéisés dans un sac en polyéthylène puis le mélange a été transvasé dans la colonne de migration. La quantité de P utilisée est équivalente à une fertilisation de 838 kg engrais/ha qui est utilisée

pour la culture de laitues. Le Cd ajouté pour toute la colonne de sol est égal à 10 mg Cd.kg^{-1} qui est peut être une quantité élevée par rapport à la littérature, mais de peur de la non-détection de cet ETM dans l'eau infiltrée ou dans les *Lactuca sativa*, cette quantité a été sélectionnée d'une part. D'une autre part, en se basant sur l'étude d'Aghababaei et al. 2014 sur les effets de Cd sur les phosphatases alcalines dans un sol calcaire sableux à pH 8,1, de Son et al. 2011 sur les effets de la compaction et de la présence de Cd sur le développement de *Paronychiurus kimi* et sur l'étude de Camobreco et al. 1996 sur la mobilité des ETM dans les colonnes de migration et comme on projetait l'idée d'étudier les effets du Cd, de la compaction et de fertilisation phosphatée sur le développement de *Lactuca sativa* dans un sol basique argileux, les activités enzymatiques et le développement bactérien, ces quantités de P et de Cd ont été choisies.

II.2.4 Plan de l'expérience

Comme déjà cité précédemment, la migration est observée sous deux compactions de sol non fertilisé et des quantités d'engrais et de cadmium différentes. Les traitements sont répétés trois fois (A, B et C) et ils sont définis dans les colonnes par:

T1 : Sol compacté	T5 : Sol compacté + Superphosphate
T2 : Sol non compacté	T6 : Sol non compacté + Superphosphate
T3 : Sol compacté + Cd	T7 : Sol compacté + Cd + Superphosphate
T4 : Sol non compacté + Cd	T8 : Sol non compacté + Cd + Superphosphate

Ainsi, les colonnes contiennent le sol (S1) échantillonné de la région d'Ammik subissant différents traitements. La migration est observée dans 24 colonnes de migration avec 8 traitements. Un triplicata de chaque traitement est préparé. Les 24 colonnes sont distribuées d'une façon aléatoire dans la chambre de conditionnement (**Figure 21**).

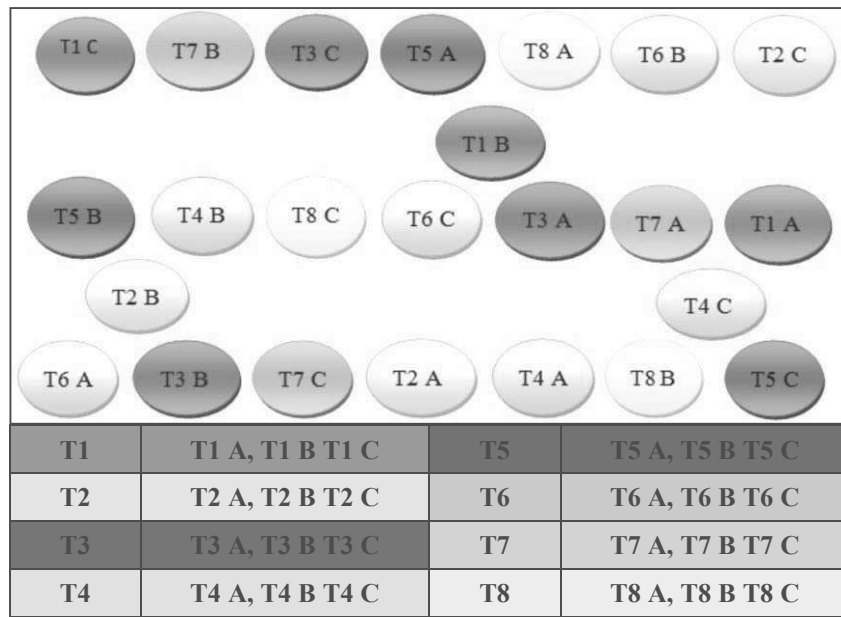


Figure 21 Représentation schématique de la distribution aléatoire des colonnes de migration.

Les graines de laitues '*Lactuca sativa*', achetées dans une entreprise agricole (Robinson Group), ont été cultivées dans un mélange de perlite et de bourre de coco dans des mottes à 20°C durant 2 semaines pour une pré-germination (**Figure 22**). Après cette période, les plantes de même taille ont été sélectionnées et leurs racines ont été lavées avec de l'eau distillée pour éliminer les composés associés. Les plantes de laitues au stade 3 feuilles et une longueur de 6 cm, comme mentionnés par Thicoipé (1997), sont ainsi prêtes pour être transplantées dans les colonnes de migration.

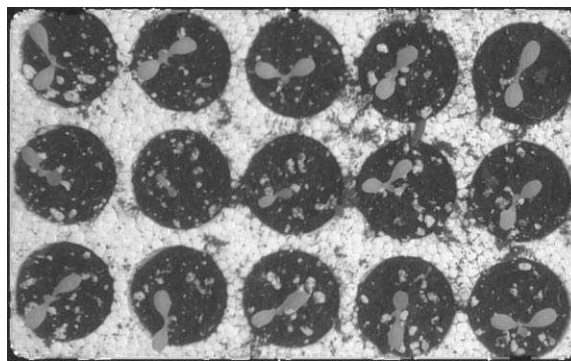


Figure 22 Plantules de laitues après 10 jours de culture.

La culture se poursuit durant 77 jours entre 19 et 21°C nocturne et diurnal, sachant que la température est régulée par un climatiseur, sous un système d'éclairage artificiel de 12 heures de lumière par jour en utilisant 6 lampes (150 w, 6400 k et 587 ma) et une humidité de 60-70% (**Figure 23**). Dans notre étude, les laitues sont arrosées vers huit heure le matin à l'aide d'un

arrosoir 3 fois par semaine, chaque lundi, mercredi et vendredi, avec de l'eau minérale (250 mL/colonne/arrosage). Cette eau avait comme concentrations en Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , F^- , K^+ , HCO_3^- , Cl^- et une conductivité électrique respectivement de 67; 1,45; 4; 0,06; 0,2; 195; 6,5; 190 mg/L et 297 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (à 25°C). Le choix de cette eau est fait en se basant sur l'absence d'ETM toxique tel que le Cd, le Pb et le Cu pour ne pas avoir une nouvelle source d'apport de ces éléments autres que le fertilisant phosphaté et le chlorure de cadmium ajouté aux colonnes. L'eau des infiltrats a été collectée 3 fois, de sorte d'avoir un volume suffisant pour faire les analyses (1^{ère} collecte: 450 mL, 2^{ème} collecte: 700 mL, 3^{ème} collecte: 650 mL), durant l'expérience dans des bouteilles PE, comme mentionné dans la section § II.2.1,



Figure 23 Culture des laitues dans une chambre conditionnée au 65^{ème} jour de culture.

II.2.5 Suivi expérimental des colonnes de sol

Avant la caractérisation et la mise en place du système de colonnes, un test de germination a été effectué avec quatre traitements différents: un contrôle, (TG1 et TG2) en présence de Cd, TG3 en présence de superphosphate et TG4 en présence de Cd et de superphosphate. Ce test a été réalisé pour déterminer quelle proportion de semences va germer dans les différents traitements et produira des plantules normales (des plantules qui comportent les structures essentielles, racines, tiges et des réserves alimentaires suffisantes), capables de se développer en plantes matures pour leur reproduction (Rao et al. 2006). Pour chaque traitement répété trois fois, vingt graines de laitue sont semées d'une manière uniforme sur une

couche mince (1 cm) de sol humidifié avec de l'eau dé ionisée dans des boites de Pétri de diamètre 9 cm et de hauteur 2 cm. Ces boites de Pétri ont été stérilisées auparavant en les trempant dans de l'eau de javel (20%) pendant 10 minutes. Après 5 jours d'incubation à l'obscurité et à 24°C, le taux de germination (TG) est calculé suite au comptage du nombre de graines germées selon la formule:

$$TG = \frac{\text{nombre de graines germées}}{\text{nombre de graines totales}} * 100.$$

La **Figure 24** montre le test de germination effectué dans les différents traitements:

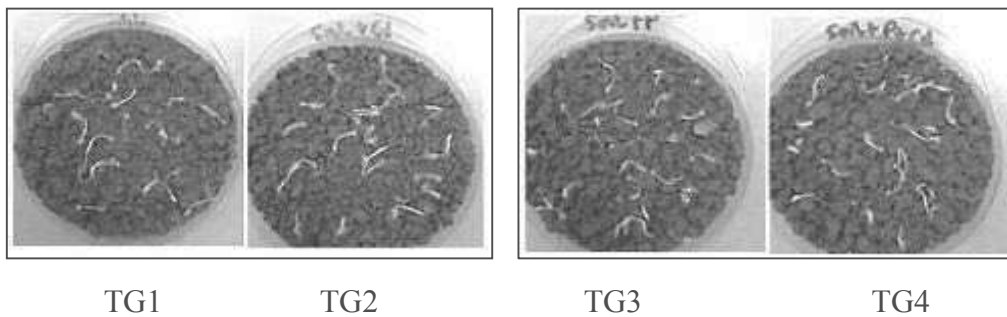


Figure 24 Test de germination.

Avant son utilisation, le sol a été séché, tamisé et homogénéisé pour subir une caractérisation physico-chimique avant son remplissage dans les colonnes. Ensuite, après 77 jours de culture des laitues dans les colonnes de migration, le sol dans les colonnes en PVC a été subdivisé en six strates (0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm, 15-20 cm, 20-30 cm et 30-40 cm). Les **Figure 25** et **Figure 26** montrent l'ensemble des démarches expérimentales effectuées sur le sol, les strates des colonnes, les laitues cultivées (**Figure 26a**) et l'eau infiltrée (**Figure 26b**) pour déterminer les caractéristiques physico-chimique, biologique et ou morphologique.

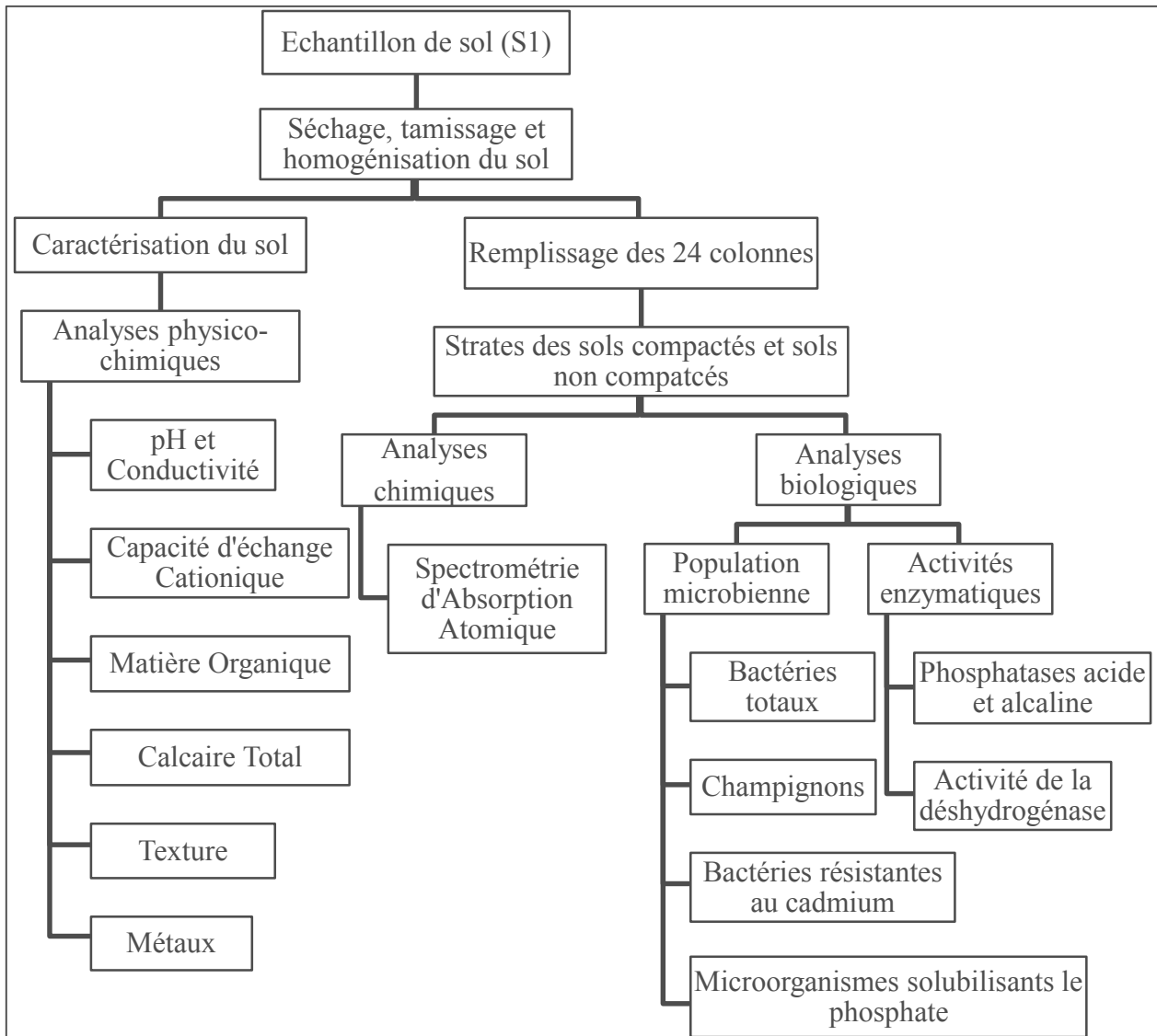


Figure 25 Procédure de caractérisation du sol S1 et celle après 77 jours de culture.

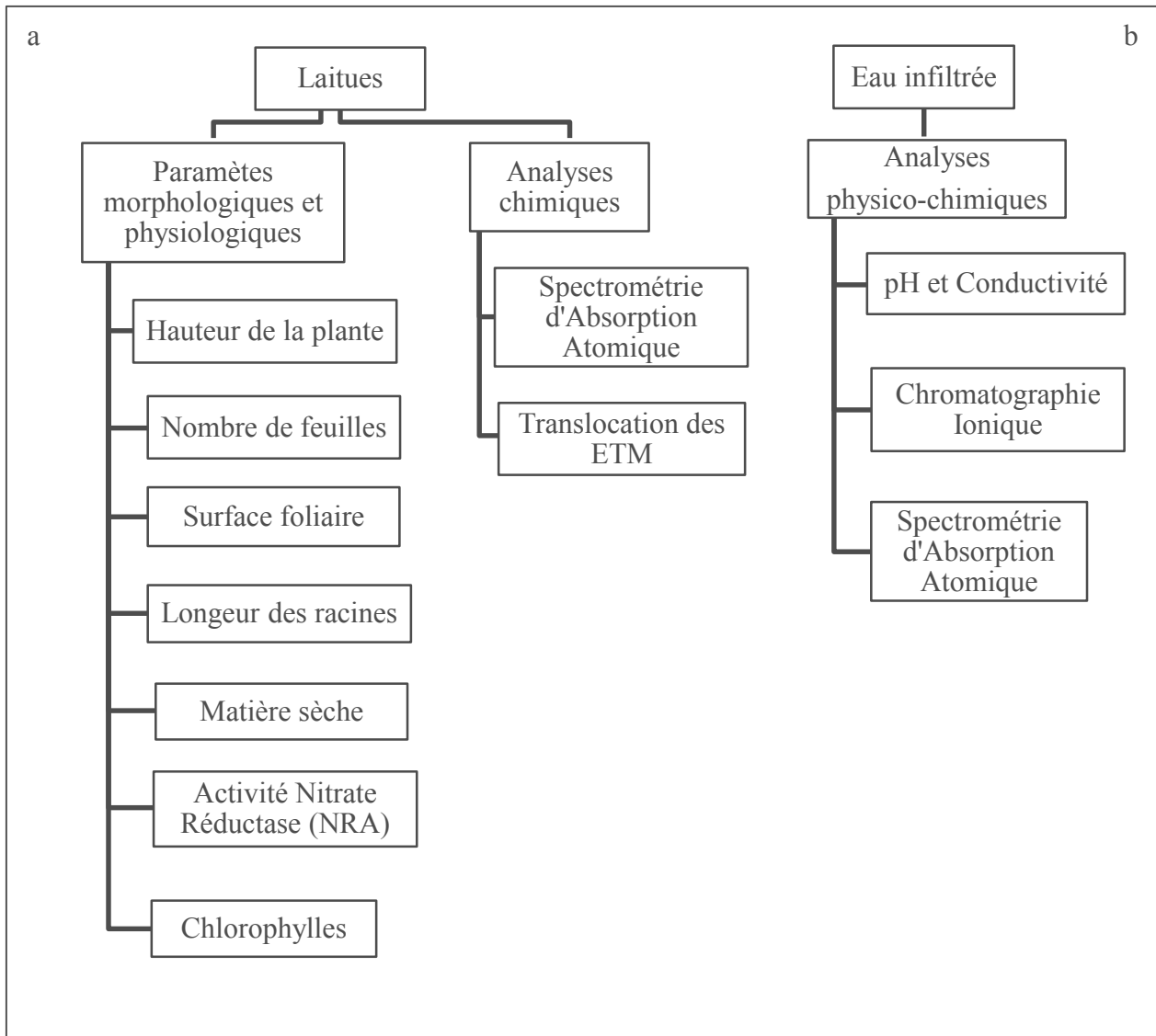


Figure 26 Démarche expérimentale de caractérisation: a) des laitues cultivées et b) de l'eau infiltrée des colonnes de migration.

Le deuxième échantillon de sol récupéré par la carotte, qui était un sol non fertilisé (S2), a été aussi caractérisé. La carotte de sol a été subdivisée sur place en 10 strates, conservées dans des sacs en polyéthylène avant d'être analysées (**Figure 27**).

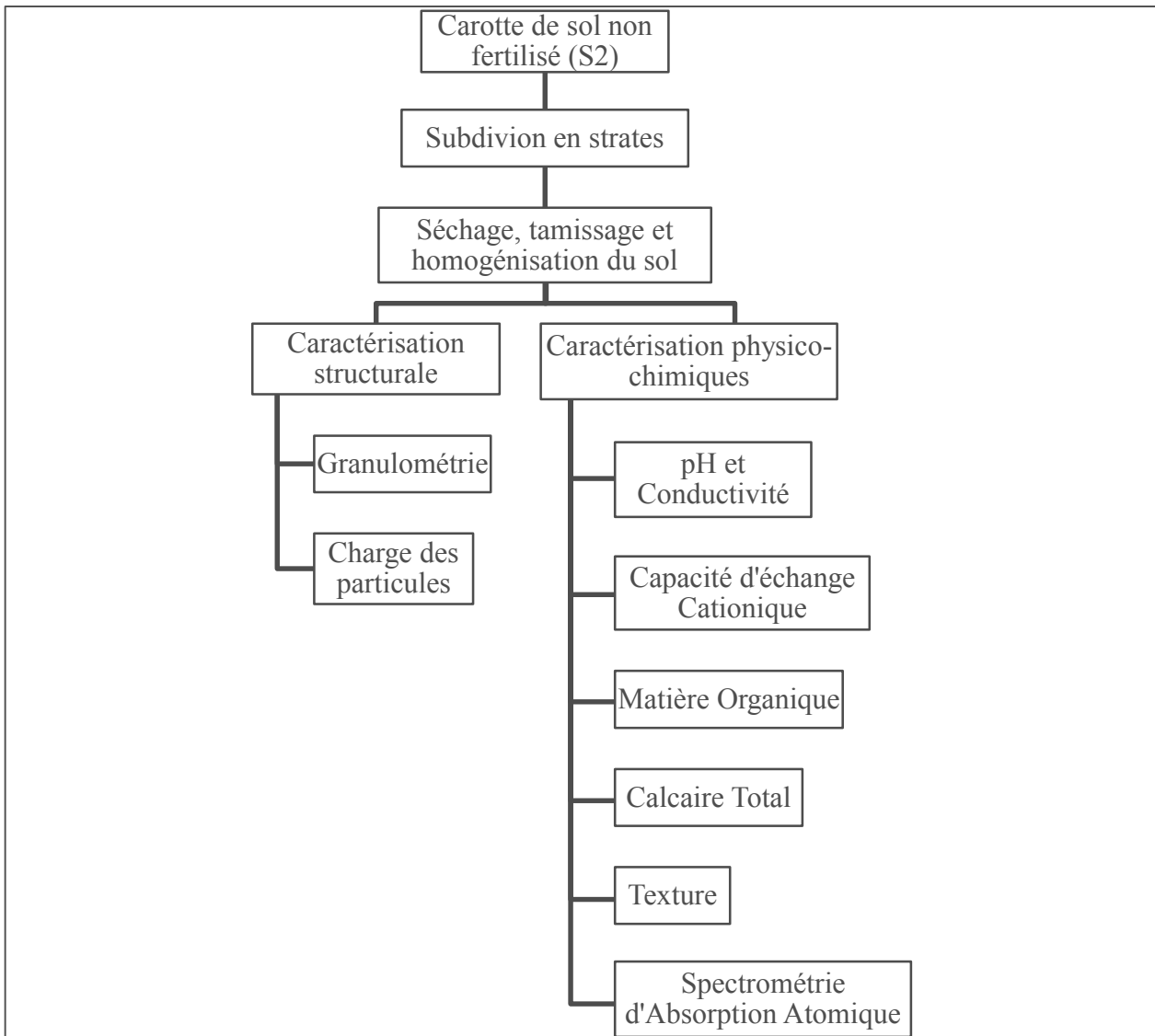


Figure 27 Caractérisation des strates du sol S2.

II.2.6 Méthodes de caractérisation

Les analyses pédologiques telles que le pH, la conductivité, la matière organique, la capacité d'échange cationique, la texture et la teneur en calcaire total ont été effectuées seulement sur la fraction inférieure à 2 mm du sol échantillonné après son séchage à l'air libre, tamisage et homogénéisation.

II.2.6.1 *pH et conductivité*

Le pH et la conductivité ont été déterminés dans une solution de sol de rapport 1:5 (sol:eau) selon les normes X 31-117 (NF ISO 10390) et X 31-113 (NF ISO 11265) respectivement pour les deux paramètres (Li and Wong 2010, Uwah et al. 2011). Un échantillon de 10 g de sol séché et tamisé a été agité avec 50 mL d'eau distillée pendant une heure et décanté avant de mesurer le pH; le mélange sol:eau (1:5) a été agité vigoureusement 5 minutes et laissé à décanter durant 2 heures pour mesurer la conductivité. Les procédures d'étalonnage du pH mètre et du conductimètre ont déjà été décrites dans la section § II.1.3.4.

II.2.6.2 *Capacité d'échange cationique (CEC)*

La CEC mesure tous les cations fixés sur le complexe argilo-humique ainsi que, en fonction du degré d'hydratation du sol, les cations dissous dans la solution du sol. C'est à dire, la somme des cations métalliques ou des bases échangeables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} et Na^{+}) est mesurée en remplissant les sites négatifs du sol par de l'acétate de cuivre, puis lessivant les molécules adsorbées par l'acétate d'ammonium. La CEC est un bon indicateur de la fertilité minérale qui varie entre 9 et 25 méq/100g de sol. La CEC est déterminée par la méthode d'acétate d'ammonium normale et neutre selon la norme NF-X31-108.

Pour déterminer la CEC, une masse de 1 g de sol est mélangée pendant une minute avec 10 mL d'acétate de cuivre (0,2 N) ($\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$; 98%, Aldrich) dans un erlenmeyer. Le mélange est ensuite filtré sur papier filtre Wattman dans une fiole. L'erlenmeyer est rincé par l'eau distillée afin d'éliminer et de filtrer toutes les particules du sol. Le filtre est ensuite rincé par 30 mL d'eau distillée. Aux résidus du sol, un volume de 5 mL d'acétate d'ammonium (1 N) ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) est ajouté 3 fois pour obtenir les ions Cu^{2+} liés aux particules de sol dans un nouveau erlenmeyer. Le volume du filtrat est ajusté à 20 mL par de l'eau distillée et un ajout de 5 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH , 25% w/w, Scharlau) est effectué pour obtenir une couleur bleue.

La mesure de la densité optique des ions Cu est faite à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda=540$ nm. L'instrument utilisé est un spectrophotomètre VWR modèle SP 2000. La CEC est normalement exprimée en nombre de charges du cation pour 100 g de sol (méq/100 g ou cmol/Kg). Le milliéquivalent correspond à la masse équivalente en milligrammes. Par exemple, une masse de 20 g de Ca^{2+} représente 1 équivalent ou 1000 méq de Ca^{2+} et 18 mg de NH_4^{+} représente 1 méq de NH_4^{+} .

Ainsi la CEC est calculée selon l'équation suivante:

$$\text{CEC (m\acute{e}q/100 g)} = C * \frac{1g * 1mol * 100cmol * valence * V}{1000(mg) * M * 1(mol) * 1cmol * m}$$

avec C : la concentration massique de l'échantillon (mg/L)

valence des électrons = nombre d'électrons de valence = 2 pour le cuivre

V : volume de la solution lixiviante, dans ce cas, l'acétate d'ammonium ajouté (L)

M : masse molaire du cuivre (g/mol)

m : masse du sol utilisé (Kg)

et les constantes sont des facteurs de conversion

II.2.6.3 Teneur en Matière Organique (MO)

La teneur en MO est estimée par calcination du sol selon la norme ASTM D 2974-2007. Cette méthode consiste à mettre une masse de 10 g de sol séché et homogénéisé dans une capsule en silice. La différence de masse après séchage et calcination à 105°C et à 550°C respectivement représente la teneur en MO.

Ainsi, une capsule en silice vide est pesée et notée P1, une masse de 10 g de sol sec est placée dans la capsule et on note le poids P2 (poids de la capsule + poids de l'échantillon à analyser). La capsule et l'échantillon à analyser sont placés dans l'étuve à 105°C pendant 16 heures. Le tout est laissé à refroidir dans un dessiccateur, puis le poids P3 (poids de la capsule vide + poids de l'échantillon séché) est déterminé. La capsule est ensuite chauffée à 550°C dans le four à mouffles (Wise Therm) pendant 24 heures puis est pesée après refroidissement dans le dessiccateur, un poids P4 est déterminé (poids capsule vide + terre calcinée).

La perte au feu (F):

F= P3-P4 et peut être exprimée en %, par rapport à 100 g de terre séchée à 105°C:

$$\% F = \frac{P3 - P4}{P3 - P1} * 100$$

Ainsi, la MO est calculée suivant la formule:

% MO= Perte au feu (% F) – eau combinée à l'argile (% E)

% E = 10,5 * A/100

avec A : pourcentage de la terre séchée à 105°C et 10,5 est un facteur de conversion.

II.2.6.4 Calcaire Total (C.T.)

Le taux en calcaire total du sol est déterminé à l'aide du calcimètre de Bernard, selon la méthode EN ISO 10693 (2014) qui consiste à acidifier l'échantillon en milieu fermé par une solution d'acide chlorhydrique: en présence de carbonates, il y a un dégagement de CO₂ dont on mesure le volume. Cette méthode compare les volumes de CO₂ dégagé, sous l'action d'un acide fort, pour une masse donnée du sol et celui du CaCO₃ dans les mêmes conditions de température et de pression atmosphérique (Waterlot et al. 2011). Par cette méthode, on peut déterminer la teneur en carbonates dans le sol qui est équivalente à la teneur en C.T. Les cinétiques de décomposition par l'HCl sont variables selon les espèces chimiques. Elles sont rapides pour la calcite et lentes dans le cas de la dolomie. La présence de calcaire confère au sol des caractéristiques spécifiques en termes de comportement physique et chimique et influe sur son activité biologique. Son absence a pour conséquence une acidification du sol d'où un besoin de chaulage. La teneur en carbonates varie d'un sol à l'autre. Pour un taux de C.T ≤ 5%, le sol est considéré comme non calcaire, une teneur entre 12,5 et 25% confère au sol une propriété de sol modérément calcaire et un taux au-delà de 50% de C.T, le sol est considéré très fortement calcaire.

Une masse de 0,2 g de carbonate de calcium pur (CaCO₃, Merck) est placée dans la fiole conique du calcimètre de Bernard. Un volume de 5 mL d'HCl (Merck, 6N) est introduit dans le tube à hémolyse présent dans la fiole; ¾ du tube est rempli d'HCl. La fiole est fermée par un bouchon en caoutchouc. On règle la quantité de l'eau dans le tube de façon à ce que la partie inférieure du ménisque de l'eau soit zéro. L'ampoule est décrochée d'une main et maintenue très légèrement au-dessus du niveau de l'eau dans le tube gradué; et on agite la fiole conique pour que l'acide attaque le carbonate. Ainsi, le niveau de l'eau dans le tube de mesure est abaissé à cause du CO₂ dégagé et il faut faire descendre l'ampoule de façon à avoir les mêmes niveaux d'eau dans l'ampoule et le tube de mesure. L'opération est répétée mais en remplaçant le CaCO₃ par le sol sec.

Calcul du pourcentage de CT dans le sol :

$$\% \text{ CT} = \frac{\text{masse Carbonate de calcium} * V2}{\text{masse sol} * V1} * 100$$

avec V1 volume de gaz noté correspondant à la masse de CaCO₃ utilisée (40 < V1 < 60)

V2 volume de gaz correspondant à la masse solubilisée

V1 et V2 sont en mL

La masse de sol dépend de sa richesse en calcaire et doit être entre 0,1 et 10 g.

II.2.6.5 *Texture*

La texture est déterminée selon la méthode de l'hydromètre de Bouyoucos (Thien and Graveel, 2003). Cette méthode consiste à mélanger un poids sec de sol à un volume d'eau contenant un agent dispersant puis à verser l'ensemble dans un cylindre. Par la suite, la densité du mélange est mesurée à l'aide d'un hydromètre à divers intervalles de temps. La densité obtenue en fonction du temps de sédimentation permet d'obtenir la granulométrie ou la texture de l'échantillon analysé. L'étude de la texture est basée sur le pourcentage des différentes particules du sol (sable, limon, argile). Le sable a la plus grande taille de calibre allant de 50 μm jusqu'à 2mm. L'argile est la fraction la plus fine ($\leq 2 \mu\text{m}$), et le limon est la fraction intermédiaire allant de 2 mm jusqu'à 50 μm . Selon le pourcentage de chaque fraction, on peut grouper les sols en leur conférant leurs propres propriétés texturales.

Par exemple, un sol sableux est généralement pauvre en éléments nutritifs et a tendance à être acide. Il se réchauffe rapidement au printemps, il offre une bonne aération mais est sujet au lessivage de l'eau et des minéraux. Un sol argileux retient l'eau et les éléments nutritifs, il contient plus de 25% d'argile et a tendance à être alcalin. Il se réchauffe lentement au printemps et se compacte facilement d'où une mauvaise aération. Le sol limoneux ou sol battant est un sol imperméable à l'eau et à l'air, il se colmate très facilement d'où une asphyxie des racines des végétaux et des organismes du sol (FAO and IFA 2000, Alper et al. 2002, Massenet 2012).

Une masse de 40 g de sol sec, tamisé à 2 mm, introduite dans un bécher de 500 mL est traitée par quelques millilitres d' H_2O_2 (30% v/v) et 30 mL d'eau distillée afin d'éliminer la MO et réduire l'effervescence. Après chauffage du mélange durant une heure à 90°C, le bécher est rempli à moitié avec de l'eau distillée et la solution, et traité par 40 mL de la solution dispersive.

Celle-ci est un mélange de 35,7 g d'hexamétaphosphate de sodium (96%, Aldrich) et 7,9 g de carbonate de sodium (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich) dissout dans 900 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 8,3 en utilisant le carbonate de sodium et le volume de la solution est ajusté avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 mL.

Le mélange est agité quelques minutes pour commencer la dispersion chimique, mis au repos durant 10 minutes puis agité 5 minutes à l'aide d'un mixer et enfin transféré dans un cylindre

de 1 L. L'hydromètre est mis dans le cylindre et de l'eau distillée est ajoutée jusqu'à atteindre le volume 1130 mL. L'hydromètre est retiré, l'ensemble est agité dans le sens haut-bas puis mis au repos. Après 20 secondes, l'hydromètre est remis dans la solution et au bout de 40 secondes la densité et la température sont mesurées.

L'hydromètre est de nouveau retiré, l'ensemble est agité puis mis au repos et la densité ainsi que la température sont mesurées après 2 heures. L'hydromètre est utilisé selon les spécifications ASTM-E-100, avec échelle Bouyoucos graduée de -5 à 60 g/L.

Quand la température observée est supérieure à 18°C, il faut ajouter 0,25 g/L à la valeur mesurée par l'hydromètre pour chaque degré Celsius d'augmentation. Si la température est inférieure à 18°C, il faut soustraire 0,25 g/L à la valeur mesurée par l'hydromètre pour chaque degré Celsius.

Calcul du pourcentage des différents composants du sol:

$$\% \text{ sable} = \frac{\text{masse sol} - \text{densité (après 40 secondes)}}{\text{masse sol}} * 100$$

$$\% \text{ argile} = \frac{\text{densité (après 2 heures)}}{\text{masse sol}} * 100$$

$$\% \text{ limon} = 100 - \% \text{ sable} - \% \text{ argile}$$

Détermination de la classe du sol : Le type ou la classe du sol est déterminé en projetant les résultats obtenus sur le diagramme de texture de l'U.S.D.A (**Figure 28**).

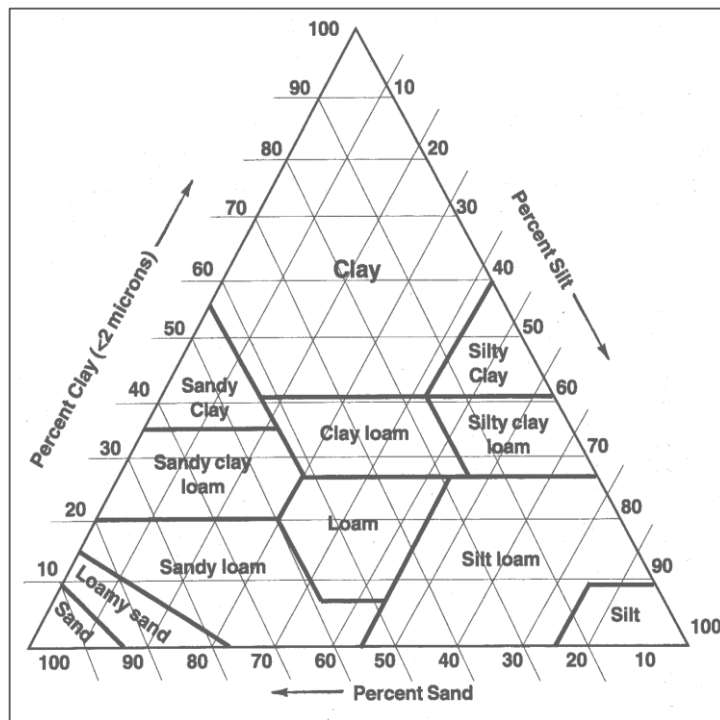


Figure 28 Diagramme de texture du sol (USDA).

II.2.6.6 Analyse des métaux traces (SAA)

Le dosage des ETM dans le sol a été fait par minéralisation et digestion à l'eau régale. Une masse de 3 g (± 2 mg) de sol séché a été incubée avec quelques mL de H_2O_2 , 7 mL HNO_3 (14 M, Merck) et 21 mL HCl (12 M, Merck) pendant 16 heures à température ambiante. Chaque digestion d'échantillon est répétée trois fois. La solution est chauffée sous reflux à 50°C pendant 30 minutes puis à 120°C durant 2 heures en s'assurant que la zone de condensation est inférieure à 1/3 de la longueur du condensateur pour permettre le refroidissement. Sur le mélange refroidi on ajoute 10 mL HNO_3 dilué (0,5 M) et on filtre sur un filtre PTFE de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore). Le volume du filtrat est ajusté jusqu'à 50 mL en ajoutant de l'acide nitrique dilué (0,5 M). Le mélange acide est conservé à 4°C jusqu'au temps de l'analyse. La mesure du Cd, Zn, Pb, Fe, Ca, Cu et Al a été réalisée par Spectroscopie d'Absorption Atomique (Rayleigh WFX-210 équipé d'un échantillonneur automatique WF-10A); les procédures d'étalonnage ont déjà été décrites dans la section § II.1.3.6.

Les colonnes de migration ont été remplies, selon deux modes de compaction, de sol séché, tamisé à 7 mm et homogénéisé. Après 77 jours de culture des laitues, les colonnes en PVC sont coupées longitudinalement et chaque carotte de sol est divisée en six strates de haut en bas (0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm, 15-20 cm, 20-30 cm et 30-40 cm) (Figure 29a).

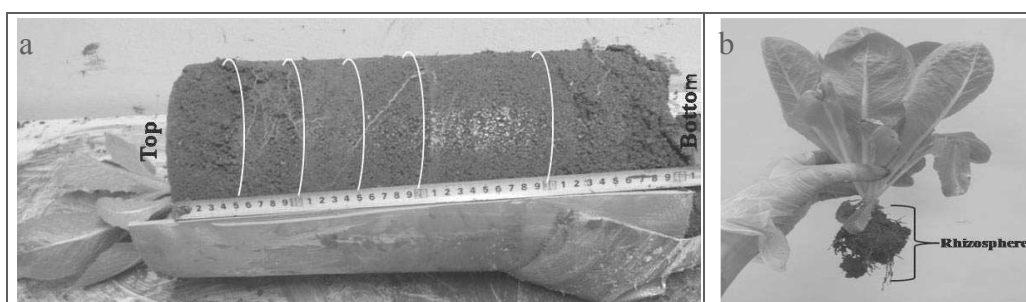


Figure 29 a) Les différentes strates de sol et b) la rhizosphère.

Des analyses d'ETM par SAA et des analyses biologiques ont été effectuées pour chaque strate de sol. La méthode suivie pour l'analyse des ETM dans les strates de sol est identique à celle utilisée pour le sol initial et décrite dans la section § II.2.6.6. La rhizosphère (R) a aussi subi des analyses biologiques ainsi que les strates de sol (**Figure 29b**). Le sol a été séparé des racines de la rhizosphère par simple tapotement selon Séguin et al. (2004).

II.2.6.7 Détermination de la population microbienne

Une masse de 10 g de chaque échantillon de sol est placée dans un erlenmeyer stérile de 100 mL contenant un volume de la solution dispersive (NaCl 9‰) et mis en suspension durant 30 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique.

La suspension est ensuite décantée pendant 20 minutes puis le surnageant est prélevé et dilué jusqu'à 1/10. Après cette suspension, des dilutions allant de 10^{-2} jusqu'à 10^{-7} sont faites en transférant un aliquote de 1 mL de la solution dans 9 mL de solution dispersive et ainsi de suite (**Figure 30a**).

Après les dilutions, l'inoculation sur différents milieux de culture a été réalisée en duplicat (**Figure 30b**).

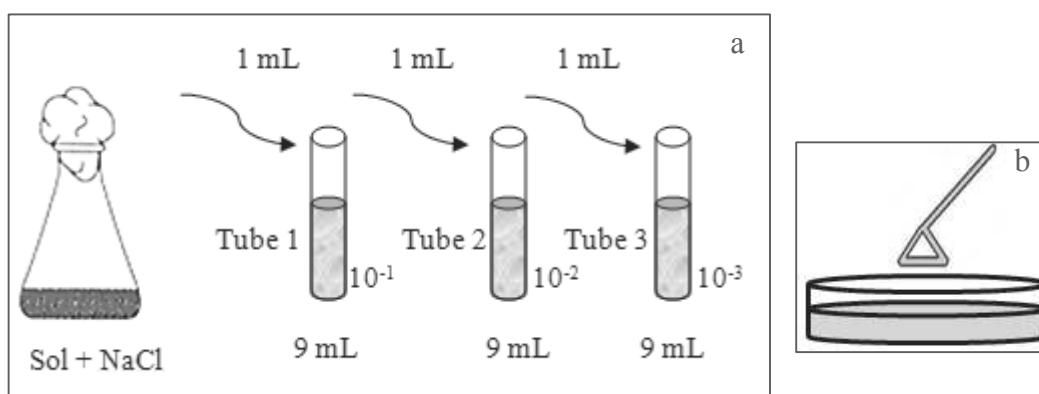


Figure 30 Représentation schématique: a) des dilutions effectuées b) de l'inoculation sur les milieux de culture.

II.2.6.7.1 *Enumération des bactéries totaux*

Le milieu de culture utilisé est le Nutrient Agar (NA, Oxoid: 5 g/L de peptone, 5 g/L de chlorure de sodium, 2 g/L d'extrait de levure et 15 g /L d'agar), non spécifique pour les bactéries auquel a été ajoutée une solution d'amphotéricine B (80%, Sigma) qui est un fongicide. Le milieu est inoculé avec les différentes dilutions réalisées auparavant; pour chaque dilution, 2 répétitions ont été effectuées. Les boîtes de Pétri ont été incubées durant 10 jours à 28°C dans l'incubateur LabTech.

La solution d'amphotéricine B est ajoutée au milieu NA lors de sa préparation après un autoclavage à 121°C pour 30 minutes et un refroidissement jusqu'à 50-60°C. Différents auteurs ont étudié le nombre total des bactéries.

II.2.6.7.2 *Enumération des champignons*

Le milieu Martin's Rose Bengal (Oxoid: 5 g/L de peptone, 10 g/L de glucose, 1 g/L de di-potassium phosphate, 0,05 g/L de Rose-Bengal et 15,5 g/L d'agar) est autoclavé à 121°C pour 15 minutes. Une fois tiédi, à 45°C, un antibiotique, la streptomycine (1 mg/mL dans 1 mM EDTA, Fluka) est ajoutée à la dose 30 mg/L afin d'inhiber la croissance bactérienne. Le milieu est ensuite réparti dans les boîtes de Pétri et ces dernières sont inoculées par les différentes suspensions diluées de l'ordre de deux répétitions. L'énumération des champignons est faite après une incubation de 10 jours à 28°C selon Gao et al. (2010) dans l'incubateur LabTech.

Ce milieu agar contient des groupements phénoliques qui inhibent la croissance bactérienne et favorisent la croissance des champignons. L'antibiotique ajouté inhibe l'initiation de la synthèse de protéines et provoque une mauvaise lecture des ARNm chez les procaryotes.

II.2.6.7.3 *Enumération des bactéries résistantes au Cadmium*

Ce genre de bactéries est isolé du sol, sur un milieu spécifique comme celui utilisé par Chihching et al. (2008), l'agar Luria Bertani (LB-Agar, high salt, Fluka: 10 g/L casein enzymic hydrolysate, 10 g/L de chlorure de sodium, 5 d'extrait de levure et 15 g/L d'agar) après un ajout de 500 µmol/L de CdCl₂. L'inoculation est répétée deux fois et l'énumération faite après une incubation de 10 jours à 28°C dans l'incubateur LabTech, Daihan labtech co. LTD. Pour inhiber la croissance des champignons dans le sol et mieux visualiser les bactéries, l'ajout d'un fongicide au milieu est nécessaire (Sheng and Xia 2006). Pour cela, l'amphotéricine B (80%, Sigma) est aussi ajoutée à ce milieu après son autoclavage.

II.2.6.7.4 Enumération des microorganismes solubilisant le phosphate (MSP)

Ces microorganismes solubilisent les composés phosphatés inorganiques et sont détectés en utilisant un milieu sélectif de type agar Pikovskaya's (PVK) (Sigma: 10 g/L de dextrose, 5 g/L de phosphate de calcium, 0,5 g/L de sulfate d'ammonium et 15 g/L d'agar) (Sharma et al. 2011). Les suspensions diluées sont inoculées sur le milieu en double répétition chacune.

Ces MSP forment des zones claires sur le milieu PVK après une incubation de 10 jours à 28°C dans l'incubateur LabTech.

II.2.6.8 Détermination des activités enzymatiques

Les activités des phosphatases et de la déshydrogénase ont été choisies pour être évaluées en fonction du Cd, la compaction et la fertilisation phosphatée. Les phosphatases sont des enzymes qui hydrolysent les esters de phosphates organiques en orthophosphates d'où la formation d'un lien entre le phosphore biologique et le phosphore minéral. La déshydrogénase est utilisée comme indicateur de l'activité biologique des sols. Elle oxyde la matière organique des sols en transférant les protons et les électrons des substrats aux accepteurs. Ces processus font partie du cycle respiratoire des microorganismes des sols et dépendent du type du sol et des conditions aériennes et de l'eau.

II.2.6.8.1 Phosphatases (acide et alcaline)

Les activités phosphatases ont été mesurées à deux pH différents: pH 6,5 pour les acides et pH 11 pour les activités alcalines puisque chacune d'elle est distinguée par un pH optimum d'activité.

Le milieu réactionnel préparé dans un erlenmeyer fermé de volume 50 mL est composé de 1 g de sol sec, 4 mL de la solution THAM (Tris-hydroxyméthyl-aminométhane avec les acides citrique, malique et borique, $\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich), un volume de tampon pour régler les pH 6,5 et 11 et 1 mL de la solution para-nitrophénylphosphate (pNPP) préparée dans les mêmes tampons. L'erlenmeyer est fermé à l'aide d'un bouchon et le milieu est agité pour quelques secondes puis incubé à 37°C durant 1 heure (Genlab). On enlève le bouchon de l'erlenmeyer et on ajoute un volume de 1 mL CaCl_2 (0,5 M) (Merck) et 4 mL NaOH (0,5 M) ($\geq 98\%$, pastilles, Sigma-Aldrich). Le mélange est ensuite agité pour arrêter complètement la réaction et filtré sur un papier filtre en nitrate cellulose de porosité 0,45 μm (Millipore). Chaque échantillon est répété deux fois, les standards utilisés avaient des concentrations de 0, 10, 20, 30, 40 et 50 ppm

de p-nitrophénol. L'intensité de la couleur jaune des échantillons, étalons et des contrôles a été mesurée par le spectrophotomètre Thermo Spectronic 20 Genesys à $\lambda=398$ nm.

La concentration en p-nitrophénol est ensuite calculée en se référant à la droite d'étalonnage. Ainsi, l'activité du phosphore mono-estérase est exprimée en mg p-nitrophenol de phosphate (pNP)/masse sol sec (g) et temps d'incubation (heure) (Sardans et al. 2008).

II.2.6.8.2 Déshydrogénase

L'activité de la déshydrogénase a été observée selon la méthode de réduction du chlorure de 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) en triphenylformazan (TPF) par le méthanol.

Une masse de 6 g de sol a été mélangée avec 60 mg de carbonate de calcium pur (CaCO_3 , Fluka) et répartie dans 3 tubes à bouchon (diamètre 1,6 cm et longueur 15 cm). A chaque tube, on ajoute 1 mL de la solution TTC 3% (Fluka) et 2,5 mL d'eau dé-ionisée et on agite les tubes sur vortex. Le TTC préparé est mis à l'obscurité pour éviter sa réduction en TPF en présence de lumière. Les tubes sont ensuite fermés pour avoir un milieu anaérobique et incubés à 37°C (Genlab). Après 24 heures d'incubation, le TPF est extrait en ajoutant 10 mL de méthanol ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich) suite à une agitation pendant 1 minute sous vortex. Ce mélange est filtré sur un papier filtre Whatman # 42 et le filtrat est recueilli dans un erlenmeyer de volume 250 mL. La verrerie utilisée pour la filtration et les tubes ont été rincés par 20 mL de méthanol jusqu'à ce que la couleur rouge du filtrat disparaisse. Le volume du filtrat est ajusté à 100 mL à l'aide du méthanol et l'intensité est mesurée par le spectrophotomètre Thermo Spectronic 20 Genesys sous $\lambda=485$ nm en utilisant le méthanol comme blanc. Chaque échantillon a été répété deux fois. A partir de la solution stock de TPF (100 mg/L), des standards ont été réalisées par des dilutions de la solution stock pour tracer la courbe d'étalonnage. La solution stock de TPF ($\geq 90\%$, Sigma) est préparée en dissolvant 100 mg de TPF dans 1 L de méthanol. Les standards utilisés pour tracer la droite d'étalonnage avaient des concentrations de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 μg TPF/mL.

L'activité enzymatique est exprimée en g TPF/masse sol sec (g) (Sardar et al. 2007, Gao et al. 2010, Kumar et al. 2013).

II.2.6.9 Caractérisation des laitues

Une mesure de la croissance aérienne, la hauteur des plantes, le nombre de feuilles par plante, l'Activité de la Nitrate Réductase (ANR) et le contenu en chlorophylles ont été effectués chaque semaine durant les 11 semaines de la culture.

II.2.6.9.1 *Activité de la Nitrate Réductase (ANR)*

Une masse de 0,5 g de tissu frais des feuilles est coupée de la plante en petits morceaux au jour $j=70$ de culture de laitues. Ces morceaux ont été incubés pendant 2 heures à l'obscurité et à 28°C (LabTech) des tubes contenant 2,5 mL d'une solution A et 2,5 mL d'isopropanol (5%) (C_3H_8O , $\geq 99,5\%$, Scharlau) (Jaworski 1971). La solution A étant un mélange de tampon phosphaté de pH égal à 7,5 et du nitrate de potassium (0,03 M) (KNO_3 , $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich).

Un volume de 0,4 mL des tubes incubés a été transféré dans un nouveau tube contenant 0,3 mL de sulphanilamide (1%) (pur, Merck) et 0,3 mL de naphthyléthylène diamine hydrochlorique (0,02%) (NEDHCl, $> 98\%$, Sigma-Aldrich). Après 20 minutes, une coloration rose se développe due à la diazotisation et le volume est ajusté à 5 mL par de l'eau distillée. Ainsi, le nitrite est mesuré par le spectrophotomètre (Thermo Spectronic 20 Genesys) à une longueur d'onde $\lambda=540$ nm et l'activité de la nitrate réductase est déterminée et déduite de la droite d'étalonnage. Les standards de concentrations 0, 25, 50, 100, 150, 200 et 250 nM ont été préparés en utilisant le nitrite de sodium, la solution A, l'isopropanol, sulphanilamide et le NEDHCl. Ainsi l'ANR est calculée selon l'équation ci-dessous:

$$ANR (\mu\text{mole NO}_2/(\text{g.h})) = \frac{\text{concentration en nitrite obtenue}}{\text{masse fraiche des feuilles (g)}}$$

II.2.6.9.2 *Contenu en chlorophylle*

Des carrés de 1 cm x 1 cm de feuilles fraîches ont été coupés de la plante au 70^{ème} jour de culture et la chlorophylle a été extraite à l'acétone (80%) (Acétone, ACS Reagent, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich) après 24 heures d'incubation à l'obscurité à 20°C. La chlorophylle totale (a) et (b) est déterminée par la lecture des absorbances mesurées à 663 nm et 645 nm à l'aide du spectrophotomètre (Thermo Spectronic 20 Genesys). La même technique de dosage a été utilisée dans l'étude de Li et al. 2010. Ainsi la chlorophylle totale est obtenue selon l'équation suivante (Arnon 1949):

$$\text{Chlorophylle totale } (\mu\text{g/mL}) = 20.2 * (A_{645}) + 8.02 * (A_{663})$$

avec A_{645} et A_{663} : absorbances obtenues à 645 nm et 663 nm respectivement.

Après 11 semaines de culture, les laitues sont récoltées séparément. La hauteur de la plante, le nombre de feuilles par plante ont été mesurés. Les laitues ont été ensuite coupées au niveau des

racines et la longueur de la racine principale est mesurée. Les différentes parties des plantes (tige, feuille et racine) ont été ensuite transvasées dans un sac en papier où leur poids frais a été mesuré à l'aide d'une balance de précision. Leurs masses sèches ou poids secs ont été obtenus par séchage des différentes parties séparément dans l'étuve à 80°C pendant 48 heures. Ainsi, les analyses suivantes ont été faites.

II.2.6.9.3 *Surface foliaire*

Après la récolte, les feuilles de la plante ont été photocopiées sur des feuilles A4. Les photocopies ont été coupées et leurs masses déterminées. En même temps, la masse et la surface de la feuille A4 ont été déterminées. Et par une simple règle de trois, la surface des feuilles est obtenue (Bonn 2005). En fait, cette méthode d'estimation de la surface foliaire est relativement imprécise avec des feuilles ridées.

Surface de la feuille A4 \longrightarrow masse de la feuille A4
Surface foliaire des plantes ?? \longleftarrow masse des photocopies des feuilles

II.2.6.9.4 *Éléments traces métalliques dans les plantes*

Après séchage de la plante, les feuilles et les racines ont été séparées. Dans un bécher de 150 mL, une masse entre 0,5 et 1 g ($\pm 0,1$ mg) de feuilles ou de racines séchées a été incubée dans 20 mL d'acide nitrique HNO₃ (14 M, Merck) durant 16 heures. Le bécher est fermé pour éviter la perte. La solution a été chauffée durant 4 heures à 50-60°C puis durant 2 heures à 80°C. Après refroidissement, le mélange a été filtré sous vide sur une membrane en nitrate de cellulose de porosité 0,45 μ m (Sartorius). Le volume du filtrat est ajusté jusqu'à 25 mL en ajoutant de l'eau ultrapure (18,2 M Ω). Le mélange acide est conservé à 4°C jusqu'à l'analyse du Cd, Zn, Pb, Fe, Cu et Ca par Spectroscopie d'Absorption Atomique.

Les concentrations de ces ETM dans les différentes parties de la plante sont dosées. Ainsi, le facteur de bioaccumulation du Cd dans *Lactuca sativa* peut être calculé en se référant à sa concentration dans la strate de sol 0-10 cm.

II.2.6.10 *Caractérisation de l'eau infiltrée*

L'eau infiltrée à travers la colonne de sol a été récupérée à la 3^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} semaine de culture pour les différents traitements soit 24 échantillons d'eau à chaque collecte. Le volume récupéré, le pH et la conductivité ont été mesurés. Les deux derniers paramètres ont été analysés par les instruments décrits dans la section § II.1.3.4. Les échantillons ont été filtrés

par un filtre seringue en nylon (Sartorius) ($0,45 \mu\text{m}$) et ont subi une analyse par chromatographie ionique décrite dans la section § II.1.3.5 pour mesurer les chlorures, nitrates et sulfates et par absorption atomique dans la section § II.1.3.6 pour mesurer le cadmium, le plomb et le zinc.

II.2.6.11 *Caractérisation du sol de la carotte prélevée*

La carotte de sol non fertilisé (S2) a été divisée en plusieurs strates sur les 80 cm pour obtenir 10 échantillons: 0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm, 15-20 cm, 20-25 cm, 25-30 cm, 30-40 cm, 40-50 cm, 50-60 cm et 60-80 cm. Ces échantillons ont été séchés à température ambiante et tamisés à 2 mm à l'aide d'un tamis en plastique.

Le pH et la conductivité, la CEC, la matière organique, la teneur en calcaire total, la texture et la teneur en ETM des différentes strates du sol ont été analysées comme dans les sections § II.2.6.1, II.2.6.2, II.2.6.3, II.2.6.4, II.2.6.5 et II.2.6.6 respectivement.

II.2.6.11.1 *Granulométrie*

La masse de l'échantillon varie selon sa nature de quelques 10 mg à 5 g. L'échantillon est tout d'abord homogénéisé et émiétté puis additionné d'un volume de 180 à 250 mL d'eau ultrapure ($18,2 \text{ M}\Omega$) pour l'analyse.

L'appareil utilisé est le Partica Laser Scattering Size Distribution Analyzer LA- 950V2 (Horiba).

Cette technique est basée sur le principe de la diffraction de la lumière en utilisant un laser à deux sources. Les particules en suspension diffractent la lumière émise par un faisceau laser. Elle permet de mesurer la taille comprise entre $0,01$ et $3000 \mu\text{m}$ et les rayons des particules.

Le phénomène débute par le pompage de l'échantillon dans un agitateur. L'échantillon est ensuite transféré dans une cellule en quartz devant le faisceau laser. Vu que cet appareil couvre une large gamme de tailles, deux sources de lumière à différentes longueurs d'onde sont utilisées. La première, destinée aux microparticules ($> 0,5 \mu\text{m}$) possède une longue longueur d'onde (diode laser de 650 nm); la deuxième, possédant une courte longueur d'onde, permet de discerner les particules colloïdales ($0,01$ - $0,5 \mu\text{m}$), (diode de 405 nm émettant le bleu clair).

II.2.6.11.2 *Le Potentiel Zeta*

Le sol séché de chaque strate a été tamisé à $0,45 \mu\text{m}$ sur un tamis en nylon. Une masse de 100 mg de sol est mise en suspension dans 50 mL d'eau ultrapure ($18,2 \text{ M}\Omega$). Cette

suspension est placée dans un bain à ultra-sons durant 5 minutes et ensuite injectée dans la cellule à mesure et pompée durant 1 minute. Toute particule chargée en contact avec de l'eau acquiert une double couche électrique. Le potentiel Zêta (mV) donne des informations sur cette charge électrique et par la suite sur la stabilité des colloïdes en suspension. Sous l'effet du champ électrique créé par deux électrodes (+) et (-), ces particules vont migrer dans une direction ou dans l'autre. Cette couche est effectivement une double couche et peut être divisée en deux régions distinctes: La région interne ou couche compacte directement en contact avec la surface de la particule colloïdale, et la région externe ou couche diffuse. Ces deux régions sont séparées par le plan de Stern. Les colloïdes étant chargés négativement, la couche compacte comprend essentiellement des ions chargés positivement. De ce fait, le déplacement d'un colloïde est décelé par micro-électrophorèse: les ions entourant le colloïde se déplacent avec ce dernier vers l'électrode de charge opposée à celle du colloïde; la mobilité électrophorétique ($\mu\text{.cm/Volt.sec}$) est ensuite transformée en potentiel ζ (mV) en utilisant la formule de von Smoluchovski. La valeur du potentiel zêta permet d'estimer la force de répulsion entre particules et donc la stabilité de la solution à long terme.

L'appareil utilisé est le Zeta-Meter 4.

II.3 Culture des laitues en milieu hydroponique

Dans notre recherche et le questionnement des agriculteurs, on a trouvé qu'au Liban, il y a une production non négligeable de *Lactuca sativa* dans une culture hydroponique. La culture hydroponique est plus simple, que celle dans le sol, à mettre en place et à manipuler et moins chère du point de vue maintenance.

Dans la littérature, cette culture hydroponique a été utilisée pour évaluer la phyto-extraction du cadmium et du plomb dans les plantes de tournesol, ricinus, alfalfa et moutardes (Zhi-xin et al. 2007), pour étudier l'effet du cadmium sur l'activité métabolique des plantes d'*Avena sativa* (Astolfi et al. 2004) et le stress oxydatif du cadmium dans les plants de moutarde (Armas et al. 2015). Deux conditions doivent être remplies pour qualifier une culture hydroponique: les nutriments doivent être acheminés vers les racines par l'eau d'arrosage et le substrat, s'il y en a, doit être inerte comme la fibre de coco, la balle de riz carbonisé, la perlite, la vermiculite, etc. (Berry and Knight, 1997). La distribution du cadmium et ces effets sur la morphologie des laitues cultivées dans un sol sera étudié mais pour mieux comprendre ces phénomènes il a fallu faire la culture hydroponique des laitues dans les mêmes conditions que la culture dans le sol mais cette fois en absence de cette matrice de sorption et en étudiant la spéciation du Cd dans la solution de Hoagland modifiée a été réalisée en utilisant le modèle Visual MINTEQ.

Tous les nutriments nécessaires à la croissance des plantes sont trouvés dans la solution nutritive appelée 'Solution Hoagland' développée en 1933 par D.R. Hoagland et D.I. Arnon. Cette solution contient normalement du $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Mais dans notre étude, on a omis l'ajout de ce produit pour ne pas avoir une source du phosphore aux plantes autre que le superphosphate.

Cette solution est préparée en utilisant du KNO_3 (KNO_3 , $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) (60,662 mg/L), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ACS reagent, 99%, Sigma-Aldrich) (94,4 mg/L), MgSO_4 (MgSO_4 , anhydrous, $\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich) (49,2 mg/L), H_3BO_3 (ACS reagent, $\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich) ($2,86 \cdot 10^3$ mg/L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ReagentPlus, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) ($1,81 \cdot 10^3$ mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ReagentPlus, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) ($0,22 \cdot 10^3$ mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ACS reagent, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) ($0,08 \cdot 10^3$ mg/L), $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (AR Grade, $\geq 85\%$, Himedia) ($0,02 \cdot 10^3$ mg/L), EDTA (BioUltra, anhydrous, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) ($2,61 \cdot 10^3$ mg/L), KOH ($\geq 85\%$ KOH basis, Sigma-Aldrich) ($1,9 \cdot 10^3$ mg/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ACS reagent, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) ($2,49 \cdot 10^3$ mg/L) à pH=6.

II.3.1 Préparation et conditionnement du système

Pour étudier l'accumulation du Cd par la *Lactuca sativa* traitée par du phosphore, nous avons choisi d'appliquer 15 traitements différents en triplicat. On a utilisé cette technique afin de faire une comparaison entre la culture en sol et la culture hydroponique des laitues en présence d'engrais phosphaté et de cadmium afin d'éliminer le rôle de sol dans les phénomènes de transfert métaux-engrais-laitue. Pour cela, 45 réservoirs en plastique ont été utilisés pour stocker la solution de Hoagland et cultiver les laitues traitées différemment. Ces réservoirs cylindriques de capacité 1150 mL sont enroulés par un film noir pour minimiser la croissance algale (Berry and Knight, 1997). 90 disques en styrofoam ont été coupés pour les mettre sur l'ouverture des réservoirs. Ces disques ont été perforés en 2 endroits: au milieu du disque par une ouverture de 2 cm et sur un endroit aléatoire d'ouverture 0,5 cm. L'entrée de l'oxygène au système a été assurée par une paille introduite à travers le trou de 0,5 cm. 45 disques avaient une épaisseur 1 cm et les autres 2 cm. Chaque disque de 1 cm a été collé au disque de 2 cm par une colle adhésive blanche et un filtre de 5 mm a été placé entre les deux disques. Ce filtre a été utilisé comme support pour les laitues puisque les racines sont passées à travers ces ouvertures de 2 cm pour arriver à la solution nutritive du réservoir (**Figure 31**). Les réservoirs avec les laitues ont été distribués de façon aléatoire dans le laboratoire conditionné à température entre 20 et 23°C et une lumière continue au cours du temps.

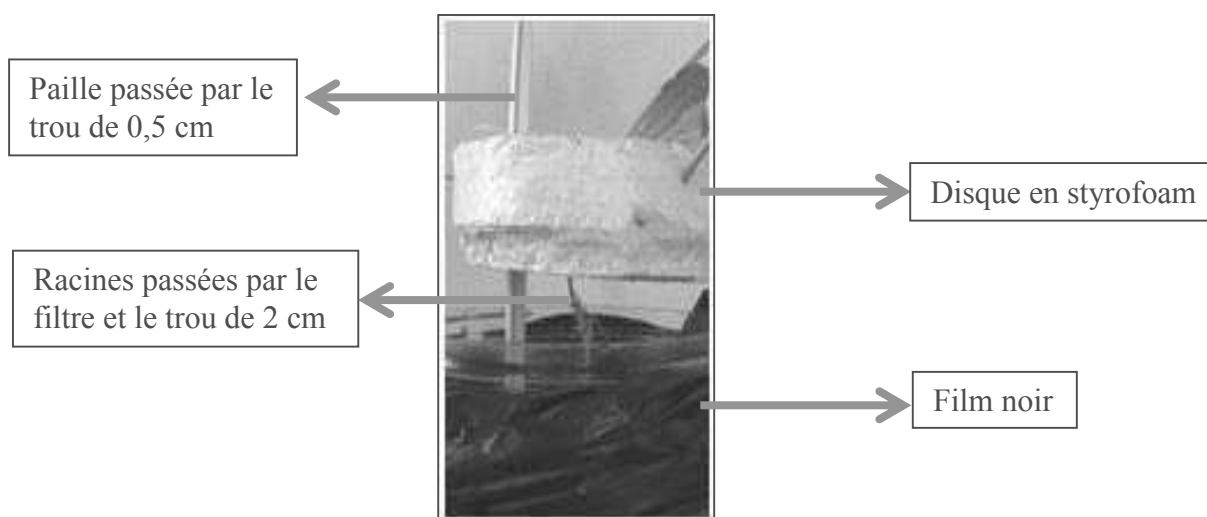


Figure 31 Préparation des réservoirs.

II.3.2 Traitements du système hydroponique

Dans la solution Hoagland, des concentrations différentes de phosphore provenant du superphosphate simple utilisé dans la partie 2 ont été ajoutées. On définit les concentrations par $P_1 = 78,88 \text{ g/L}$ et $P_2 = 373,8 \text{ g/L}$, le volume ajouté était de 10 mL. Ces valeurs de P_1 et P_2 sont équivalentes à 686 mg engrais/L et 3250 mg engrais/L respectivement qui peuvent être exprimées en P_2O_5 par $P_1 = 123,34 \text{ mg } P_2O_5/L$ et $P_2 = 585 \text{ mg } P_2O_5/L$. En plus du phosphore, le Cd est ajouté sous forme de $CdCl_2 \cdot H_2O$ (0 mL; 2,5 mL; 5 mL; 7,5 mL et 10 mL) à partir de la solution stock 42,8 mg/L Cd. Le volume dans les réservoirs a été ajusté à 1150 mL par la solution de Hoagland qui a été changée deux fois par semaine.

Les 15 traitements sont représentés dans le **Tableau 17**:

Tableau 17 Les différents traitements effectués sur la solution de Hoagland.

Traitements	Concentration engrais (mg/L)	Concentration en Cd (mg/L)
P0Cd0	P0 = 0	Cd0 = 0
P0Cd1		Cd1 = 0,093
P0Cd2		Cd2 = 0,186
P0Cd3		Cd3 = 0,279
P0Cd4		Cd4 = 0,372
P1Cd0	P1 = 686 ou 123,34 mg P_2O_5/L	Cd0 = 0
P1Cd1		Cd1 = 0,093
P1Cd2		Cd2 = 0,186
P1Cd3		Cd3 = 0,279
P1Cd4		Cd4 = 0,372
P2Cd0	P2 = 3250 ou 585 mg P_2O_5/L	Cd0 = 0
P2Cd1		Cd1 = 0,093
P2Cd2		Cd2 = 0,186
P2Cd3		Cd3 = 0,279
P2Cd4		Cd4 = 0,372

Ces valeurs de Cd élevées ont été choisies pour voir l'effet d'une forte contamination sur le développement de *Lactuca sativa* puisque dans la littérature, Armas et al. 2015 ont utilisé des concentrations de 3, 9 et 30 mg Cd/L dans la solution hydroponique de *Brassica juncea* pour évaluer les effets du Cd sur le développement de la moutarde et son accumulation et Dias et al. 2012 ont évalué l'effet de Cd à 0,112; 1,2 et 5,6 mg/L sur la photosynthèse et la croissance de *L. sativa*.

II.3.3 Caractérisation du système hydroponique

Un nombre de 45 laitues a été planté sur de la tourbe. Après 15 jours, les racines des laitues ont été rincées par l'eau du robinet pour se débarrasser des particules de tourbe. Les plantes de laitues ont été transférées dans les réservoirs préparés selon la méthode décrite dans la § II.3.2. Après 8 semaines de culture dans le système hydroponique, les laitues ont été analysées (**Figure 32**).

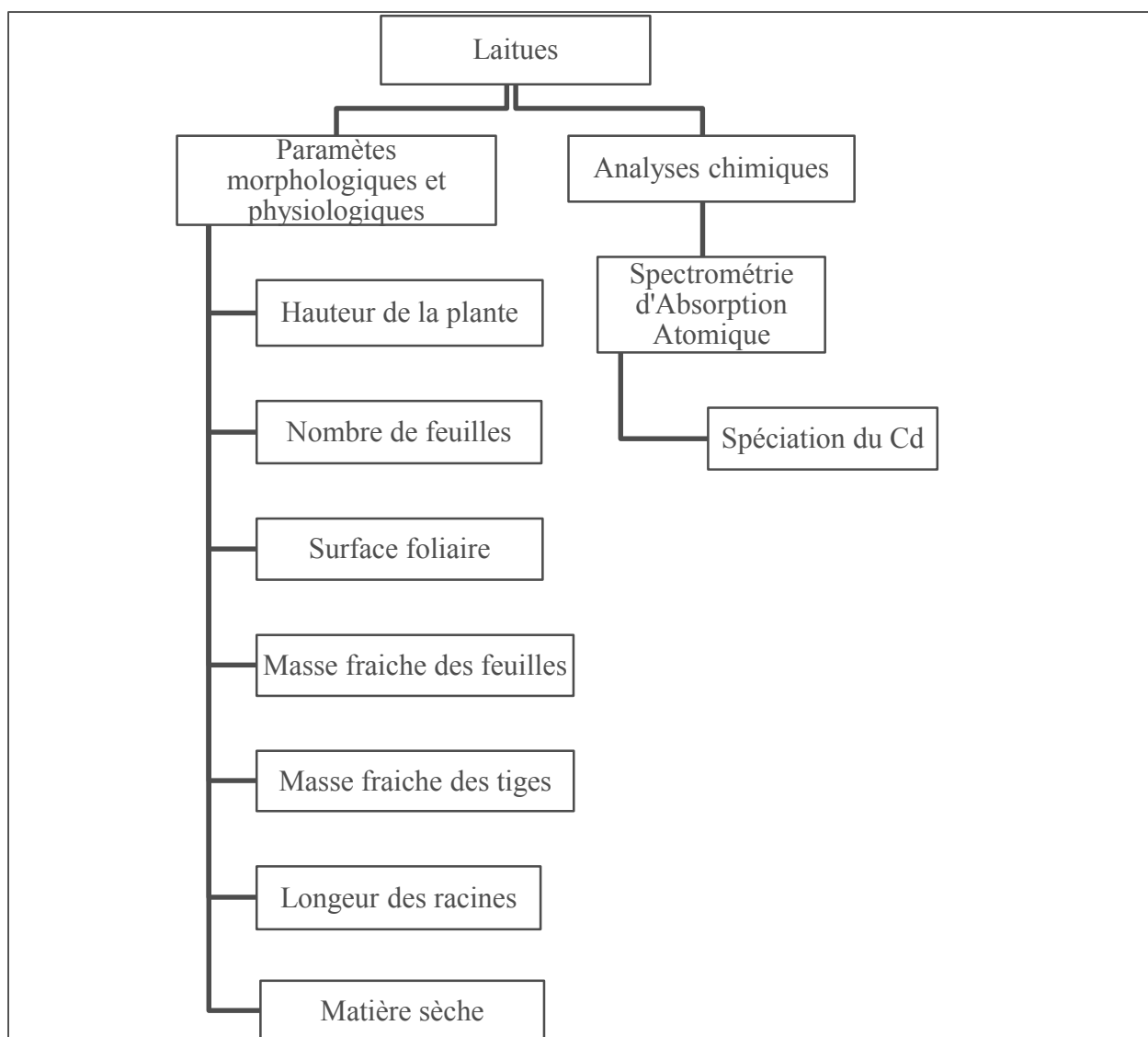


Figure 32 Caractérisations des laitues en culture hydroponique.

Un suivi visuel et une mesure de la croissance aérienne (hauteur de la plante, nombre de feuilles) des plantes ont été effectués au début et à la fin de la culture.

Après 8 semaines de culture, les laitues sont récoltées. La hauteur de la plante, le nombre de feuilles, la longueur de la racine principale ont été mesurés. Le poids frais et le poids sec des feuilles, du système racinaire et de la tige sont mesurés à l'aide d'une balance de précision ($\pm 0,1$ mg, SAT). La masse sèche ou le poids sec est obtenu par séchage des différentes parties des laitues séparément dans l'étuve à 80°C pendant 48 heures.

Ainsi, la surface foliaire a été analysée comme décrit dans la section § II.2.6.9.3 et le dosage des ETM dans les feuilles, les tiges et les racines a été déterminé de la même façon décrite dans la section § II.2.6.9.4. Mais puisqu'on a des masses de racines et de tiges inférieures à 1 g, l'incubation de ses parties (de masse 0,5 g) se fait dans 5 mL HNO₃ (14 M, Merck) et le volume du filtrat est ajusté à 10 mL au lieu de 25 mL d'eau ultrapure.

III Chapitre III: Résultats et Discussion

Le chapitre ‘résultats et discussion’ est subdivisé en cinq parties dont quatre d’entre elles sont rédigées sous forme de publications.

(A) ‘Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries’. Cette partie représente une caractérisation globale des engrais chimiques phosphatés les plus commercialisés dans le marché Est Méditerranéen. Elle fait un focus sur la composition minérale et élémentaire des engrais pour aboutir à l’identification des phases minérales principales porteuses des ETM. Cette partie se termine par une estimation des quantités d’ETM ajoutées au sol Libanais via les engrais phosphatés. Ainsi, l’usage excessif et non contrôlé des engrais phosphatés dans les sols libanais engendre des quantités énormes d’ETM dans les sols qui dépassent souvent les normes européennes. Ces résultats représentent un support scientifique pour mettre en place des réglementations qui précisent les doses d’engrais phosphatés acceptables par an et par hectare permettant de minimiser la contamination des sols par les ETM provenant de ces derniers.

Partie A

TRACE METALS IN PHOSPHATE FERTILIZERS USED IN EASTERN MEDITERRANEAN COUNTRIES

Résumé

Les engrais phosphatés sont les principales sources des éléments traces métalliques (ETM) dans les sols agricoles. La spéciation des 44 engrais phosphatés les plus commercialisés dans la région Est Méditerranéenne a été effectuée afin de prédire les quantités d'ETM lors de leur ajout dans les sols de cette région. Les anions majeurs ainsi que les ETM (Zn, Pb, Cd et Cu) ont été analysés par spectrométrie d'absorption atomique et la spectrométrie de fluorescence X. La nature des phases minérales dans l'engrais a été caractérisée par la diffraction des rayons X et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Les sulfates sont identifiés comme étant la phase porteuse principale du cadmium quand ils sont présents dans les engrais phosphatés. Les quantités de Zn et Pb dans les engrais sont en relation linéaire dans les engrais tandis que le Sb, Ag, Pd, Nb, Mo et P₂O₅ sont corrélés positivement. Les quantités annuelles moyennes de Zn, Cu, Pb et Cd ajoutées aux sols sont égales à 922, 124, 26 et 6 g/ha/an respectivement. Bien que ces quantités soient conformes aux quantités autorisées dans les pays tempérés, l'accumulation de grandes quantités de ces ETM dans les sols alcalins typiquement présents dans les pays Est Méditerranéens où règne un climat aride à semi-aride, représente l'un des scénarios les plus attendus.

Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries

Abstract¹

Phosphate fertilizers represent major sources of trace metal contaminants in agricultural soils. To predict the inputs and the fate of trace metals in soils of the eastern Mediterranean region, a speciation study was conducted using a total of 44 phosphate fertilizers commercialized in the area. The contents in major anions and potentially toxic metals (Zn, Pb, Cd, and Cu) were determined using Atomic Absorption Spectrometry (AAS) and X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF). The nature of mineral phases in the fertilizer was characterized using X-ray diffraction and Fourier Transform Infrared Spectrometry. The results show that sulfates are the main Cd-bearing phases when present in the P-fertilizer. The contents in Zn and Pb were linearly related, whereas the levels of Sb, Ag, Pd, Nb, Mo and P₂O₅ were strongly correlated to each other. The annual average inputs of Zn, Cu, Pb and Cd were calculated to be 922, 124, 26 and 6 g/ha/year, respectively. Even though such inputs comply with the maximal metals concentrations authorized in temperate countries, an accumulation of those metals in the typical arid and alkaline soils of the eastern Mediterranean countries is expected.

Adapté de la forme acceptée dans le journal Clean-Soil, Air, Water (Azzi V., Kazpard V., Lartiges B., Kobeissi A., Kanso A., El Samrani A.G., Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries).

1 Introduction

Phosphate fertilizers are chemical compounds produced from the acid treatment of apatite minerals ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 [\text{F}, \text{OH} \text{ or } \text{Cl}]$) that naturally contains minor amounts of trace metals [1]. The level of potentially toxic metals in the phosphate fertilizer depends both on the origin of the phosphate ore and on the fertilizer production process [2-4]. Thus, sedimentary phosphate rocks (about 75 to 80% of phosphate resources) contain 50 to 200 mg/kg of uranium and 2 to 20 mg/kg of thorium, whereas phosphate ores of igneous or metamorphic origins (15-17% of P-resources) show a maximum of 10 mg/kg in uranium but are rich in thorium and rare earth elements [3, 5]. The remaining 2 to 3% of phosphate ores originate from biogenic sources such as bird and bat guano deposits and mainly contain nitrogen and phosphorus [6, 7]. Radiological surveys of workers handling fertilizers confirm their exposition to high levels of radioactive elements [2, 8].

More than 30 million tons of phosphate fertilizers are used annually in the world to increase crop production and to ensure successful harvests [9-11]. This represents significant sources of potentially toxic metals in agricultural soils [12, 13]. Thus, arsenic, cadmium, zinc, iron and lead as trace metals, Uranium-238 (^{238}U), Thorium-232 (^{232}Th), Potassium-40 (^{40}K) and Radium-226 (^{226}Ra) [2, 12, 14-17] as radionuclides, have been shown to accumulate in cultivated soils following phosphate fertilization [4, 18-21].

Much less investigated is the influence of fertilizer type on the fate of potentially toxic metals in the soil. Thawornchaisit and Polprasert [22] showed that the nature of phosphate phase in triple superphosphate, diammonium phosphate and phosphate rock, contributes to stabilize cadmium in contaminated soils. Similarly, Zhang and Pu [23] evidenced a change in the availability of cadmium, copper, lead and zinc, following applications of rock phosphate, calcium magnesium phosphate, limestone and palygorskite. In the context of the remediation of contaminated soils, many authors have also demonstrated that the stabilization of potentially toxic metals such as Pb, Cu, or Zn, depends on the nature of phosphate rock used [24-26].

Toxic metals can be harmful to ecosystems and to humans due to their persistence in soil and their potential to enter the human food chain after accumulation in vegetables and consumables [13, 27]. Concentrations of Cd, Cr, Pb and Hg in fertilizers are regulated in most of the eastern Mediterranean countries but the Maximal Admissible Concentrations (MAC) differ from one country to another. Thus, cadmium and lead MAC in Lebanon are higher than those set in Finland and Germany [28, 29]. Actually, in the Middle East, contrary to European countries, soils are alkaline and submitted to arid and sub-arid climates, thus enhancing the potential for

trace metals accumulation. Therefore, Maximal Admissible Concentrations of potentially toxic metals and trace elements in fertilizers used in eastern Mediterranean countries should be adapted to the local context.

A predictive approach of the fate in soils of trace metals originating from phosphate fertilizers is therefore of great interest. It should not only be based on the determination of the total metal content in the soil, but also on the nature of the metal bearing phases since phosphate fertilizers are made up of at least two major phases. In this paper, the aim is to incite emerging eastern Mediterranean countries to set new limits of trace metals in phosphate fertilizers and better control their use in alkaline soils. Thus, we investigate the various potentially toxic metals-bearing phases present in phosphate fertilizers commercialized in the eastern Mediterranean region. Correlations between trace elements, metals, phosphate and sulfate contents in the fertilizers provide a clearer picture of metal contaminant fate in the treated soil.

2 Experimental

2.1 Fertilizer materials

A list of most commercialized phosphate fertilizers in the eastern Mediterranean region (Lebanon, Egypt, Iraq, Syria, Kingdom of Saudi Arabia and Turkey) was obtained from the Lebanese Agricultural Research Institute. A total of 44 samples were then purchased (Table 1). The P-fertilizer samples selected include two liquid P-fertilizers and 42 solid P-fertilizers. Based on the data sheets provided with each sample material, the 44 P-fertilizers were partitioned into Potassium Phosphate (2 samples), Urea Phosphate (2 samples), Superphosphate (2 samples), and Nitrogen-Phosphorous and Potassium (NPK) (38 samples). The samples were crushed and homogenized in an agate mortar, and then transferred into hermetically sealed polyethylene containers to be preserved from humidity and moisture.

Table 1 List of fertilizers used in this study and their characteristics.

Formula (N-P-K) % wt	Origin ^a	pH	EC mS/cm	NO ₃ ⁻	P ₂ O ₅	SO ₃	K ₂ O	Na ⁺	Cd	Pb	Zn	Cu	Fe	Ca
12-17+2 MgO	BE	6.68±0.02	1.535±0.005	2.5±0.3	5.8±0.2	18.9±0.1	18.2±0.8	1.92±0.01	4.81±0.08	20.8±0.1	105±1	7.5±0.1	1.56±0.04	29.2±0.4
11-12-17	IT	6.62±0.01	1.258±0.003	0*	7.33±0.02	21.7±0.1	17.5±0.8	1.98±0.01	6.17±0.22	13.82±0.03	114±2	118±1	0.86±0.01	33.5±0.7
16-8-12+2	DE	5.89±0.01	1.472±0.004	7.2±0.1	5.7±0.1	4.2±0.2	13.4±0.8	0.95±0.02	2.58±0.17	8.33±0.05	144±1	263.2±2.5	4.29±0.01	6.76±0.04
20-20-20	IT	5.06±0.01	0.923±0.001	3.4±0.3	20.6±0.2	9.42±0.01	21.3±0.8	1.89±0.01	1.92±0.05	11.1±0.8	99±1	77.5±0.6	0.39±0.01	1.29±0.04
20-20-20+TE ^b	JO	5.11±0.02	1.102±0.001	0*	20.3±0.8	0*	20.2±0.8	1.77±0.02	1.76±0.03	6.91±0.01	240.3±0.5	1.75±0.05	0.041±0.001	0.98±0.01
30-10-10+TE	JO	5.24±0.03	0.727±0.003	1.8±0.6	9.6±0.3	10.11±0.02	10.7±1.7	1.95±0.03	1.12±0.04	6.9±0.2	101.4±0.2	53.4±0.4	0.35±0.01	1.4±0.4
20-5-8+2	DE	6.94±0.03	1.018±0.002	2.6±0.5	3.8±0.2	23±1	8.36±0.04	1.95±0.01	1.95±0.03	9.28±0.07	29.7±0.2	24.1±2.2	3.6±0.1	8.54±0.03
12-12-17+2+TE	DE	6.01±0.02	1.673±0.001	5.2±0.2	5.9±0.3	34.3±0.4	18.3±1.3	1.58±0.01	3.35±0.08	11.3±0.1	30.6±0.7	10.01±0.07	3.75±0.05	10.13±0.02
17-17-17	RU	5.89±0.04	1.438±0.003	3.1±0.2	15.1±1.3	0*	18.2±0.8	1.93±0.02	2.03±0.02	12.3±0.6	128±1	13.6±0.3	2.3±0.1	11.76±0.04
16-16-16	RU	6.11±0.05	1.448±0.001	2.5±0.6	16.5±0.1	0*	16.2±0.2	1.99±0.04	1.83±0.25	11.4±0.2	153±1	14.8±0.1	1.82±0.01	11.14±0.01
15-15-15	NO	5.77±0.06	1.492±0.001	4.2±0.3	15.7±0.1	6.03±0.05	16.2±0.4	2.01±0.01	6.76±0.06	12.8±0.7	98.6±2.6	14±1	1.89±0.04	13.61±0.04
12-12-17+2MgO +22SO ₃	IT	7.33±0.02	1.021±0.002	0*	4.245±0.003	21.8±0.2	17.6±0.8	1.99±0.03	9.03±0.05	13.1±0.1	35.8±0.5	4.4±0.1	3.73±0.01	34.7±0.1
18-20% P ₂ O ₅	LB	3.61±0.01	1.022±0.004	0*	18.5±0.1	34±5	0*	2.97±0.02	5.69±0.05	9.23±0.11	92.3±0.5	7.81±0.01	0.84±0.01	59.7±1.5
15-15-15+10SO ₃	IT	3.72±0.01	1.044±0.001	1.6±0.2	5.8±0.2	13.76±0.05	15.05±0.17	1.96±0.01	7.61±0.05	13.01±0.13	37.6±0.7	16.81±0.03	4.71±0.05	39.9±0.3
12-12-17+2+20	IT	3.31±0.03	1.633±0.002	4.8±0.1	7.8±0.2	19±1	16.9±0.4	1.88±0.02	6.85±0.07	12.72±0.15	68.5±0.1	13.1±0.1	1.74±0.05	14.5±0.5
0-42-28	ES	4.41±0.04	5.549±0.001	0*	39.6±1.1	0*	28.3±0.1	0.15±0.01	1.77±0.04	8.75±0.17	294.1±0.2	59±5	0.018±0.001	0.75±0.01
20-20-20	BE	5.35±0.01	0.951±0.001	0*	20.5±0.6	1.12±0.01	20.3±0.4	1.99±0.02	1.71±0.03	12.11±0.05	28.7±0.2	20.6±2.9	0.0759±0.0001	0.4±0.2
28-14-14+TE	TR	5.11±0.01	0.678±0.003	4.2±0.7	14.8±0.4	0.62±0.02	14.9±0.8	1.95±0.01	1.19±0.03	10.1±0.4	423±1	49.2±0.5	0.58±0.01	0.75±0.06
13-40-13+TE	TR	4.79±0.06	0.962±0.003	2.3±0.1	41.3±0.7	0.577±0.002	13.9±0.8	1.97±0.01	2.04±0.05	11.7±0.1	248.9±0.2	44.6±0.1	0.481±0.003	0.7±0.1
20-20-20+TE	TR	5.18±0.02	0.888±0.003	5.4±0.6	20.4±0.9	0.7289±0.0004	19.5±0.4	1.97±0.01	1.70±0.01	10.3±0.1	400±1	65.9±0.2	0.66±0.01	0.7379±0.0003
11-9-36+TE	TR	3.58±0.04	1.337±0.002	6.1±0.1	12.91±0.05	18.1±0.1	36.4±0.8	1.96±0.01	2.79±0.06	13.79±0.14	453±1	59.9±0.1	0.64±0.01	0.8±0.1
8-8.5-6	IT	8.05±0.07	3.092±0.003	0*	8.94±0.04	0*	6.8±1.3	0.24±0.01	0.74±0.01	5.07±0.01	94.3±0.5	68.6±0.3	0.096±0.001	0.85±0.01
7-6-7	FR	6.54±0.03	0.708±0.003	2.5±0.4	6.7±0.4	19.9±0.1	6.9±0.4	1.98±0.02	2.46±0.04	10.77±0.02	377±1	84.2±1.8	5.12±0.03	37.5±0.4
20-5-10+2MgO +1Fe	IT	6.79±0.01	0.409±0.003	0*	4.8±0.1	11.6±0.1	7.5±0.4	1.96±0.02	4.26±0.03	8.08±0.16	133.1±0.3	6.06±0.03	19.1±0.1	32.7±0.2
46-48% P ₂ O ₅	LB	3.71±0.01	0.633±0.002	0*	48.1±0.2	3.4±0.1	0*	1.92±0.01	9.43±0.02	14.47±0.06	386±3	8.7±0.2	1.991±0.005	239±1
28-14-14+TE	FR	4.81±0.01	0.639±0.001	3.8±0.2	14.4±0.3	0*	14.9±0.3	2.86±0.03	0.91±0.03	9.05±0.08	204±4	1.8±0.1	0.13±0.02	0.97±0.01
20-20-20	IT	5.03±0.05	0.864±0.001	5.2±0.2	19.7±0.2	0*	19.12±0.04	1.83±0.01	2.11±0.03	13.7±0.2	114±1	30.9±3.8	0.34±0.01	0.87±0.01
20-20-20	US	6.71±0.03	1.119±0.001	2.5±0.3	20.7±0.2	0*	21±1	1.86±0.02	1.91±0.03	12.43±0.08	310±1	507±2	1.13±0.02	0.978±0.003
30-10-10	US	5.42±0.01	0.662±0.001	3.1±0.6	10.8±0.2	6.81±0.02	10.43±0.01	1.89±0.01	1.27±0.07	4.89±0.01	366±1	421±4	1.15±0.01	0.48±0.01
4-2-41	IT	4.21±0.02	1.312±0.003	0*	2.87±0.07	28.3±0.1	44.9±0.3	1.99±0.02	1.99±0.04	14.22±0.05	356±3	380±4	1.29±0.02	1.85±0.01
12-48-8	US	5.42±0.03	0.974±0.001	1.8±0.1	47.5±0.3	2.48±0.05	8.2±0.1	1.93±0.01	2.08±0.05	27.3±0.3	346±2	35.4±1.1	0.91±0.01	0.4±0.1
15-15-15+15SO ₃	BE	6.63±0.01	1.163±0.001	0*	15.2±0.2	28.58±0.04	18.6±0.4	3.82±0.01	3.88±0.14	58.5±2.5	5575±3	90.9±0.2	1.69±0.02	1.3±0.7
20-20-20+TE	SA	4.59±0.01	0.774±0.001	4.3±0.7	20.53±0.03	5.51±0.01	18.9±0.1	1.92±0.02	2.61±0.01	26.3±0.1	50.5±3.9	37.9±0.5	0.088±0.002	1.21±0.02
15-15-15	UA	6.82±0.03	1.553±0.002	0*	15.1±0.1	24.12±0.02	14.6±0.1	2.99±0.01	5.08±0.02	12.14±0.01	93±2	1.5±0.9	3.65±0.03	1.04±0.03

Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries

25-10-17	DE	5.49±0.01	0.861±0.001	4.8±0.6	10.479±0.003	3.5±0.3	16.98±0.01	2.98±0.02	0.62±0.06	7.55±0.06	171±2	77.13±0.02	0.37±0.01	0.46±0.05
20-20-20+TE		4.91±0.02	0.832±0.003	2.5±0.7	18.6±0.1	3.4±0.1	20.1±0.1	1.95±0.02	2.03±0.01	15.87±0.02	415±7	35.6±0.1	0.22±0.01	0.5±0.2
20-20-20	NO	5.62±0.03	1.291±0.002	1.7±0.1	20.4±0.2	10.43±0.05	19.9±0.3	1.92±0.01	3.42±0.04	19.12±0.43	134.4±0.1	11.83±0.05	1.33±0.04	13.7±0.2
0-52-34	BE	4.62±0.02	0.793±0.001	0*	53.1±0.4	0*	32.5±0.2	0.16±0.01	3.41±0.02	24.3±0.2	204.2±0.4	2.11±0.03	0.034±0.001	0.87±0.01
12-12-17+2MgO+20SO ₃	NL	6.51±0.02	1.369±0.001	4.8±0.2	9.4±0.2	22.81±0.04	17.2±0.4	1.56±0.01	2.29±0.02	16.13±0.03	368.6±0.5	18.6±0.1	1.81±0.03	12.6±0.2
17-5-44-0	BE	2.31±0.01	1.647±0.002	0*	44.1±0.1	0*	0*	1.42±0.02	1.75±0.04	11.2±0.8	140.4±0.3	2.03±0.02	0.361±0.003	0.45±0.01
20-20-20	IT	5.46±0.01	1.251±0.001	0*	20.61±0.01	2.77±0.03	20.07±0.05	1.95±0.01	0.99±0.12	11.94±0.16	1237±0.2	49±2	0.055±0.002	0.41±0.01
15-15-15+2MgO+15SO ₃ +5CaO+1Zn	BE	7.19±0.01	1.521±0.005	1.4±0.2	8.1±0.1	16.33±0.04	14.7±0.4	1.06±0.01	5.70±0.07	25.4±1.2	5735±4	22.3±0.1	1.59±0.01	11.01±0.03
17-44-0	JO	2.21±0.02	1.913±0.002	0*	43.1±0.1	2.84±0.02	0*	2.12±0.02	2.94±0.02	12.6±0.2	142±3	5.07±0.06	1.29±0.03	0.3±0.1
20-20-20+TE	BE	5.32±0.01	1.266±0.001	0*	20.82±0.04	3.019±0.004	18.88±0.05	1.83±0.03	2.46±0.02	14.2±0.1	515±1	91.6±0.1	0.65±0.01	1.1±0.1

^a Abbreviation of the country of origin according to the ISO (International Organization for Standardization); BE: Belgium, FR: France, DE: Germany, IT: Italy, JO: Jordan,

LB: Lebanon, NL: Netherlands, NO: Norway, RU: Russian Federation, SA: Saudi Arabia, ES: Spain, TR: Turkey, UA: Ukraine, US: United States

^b TE: Trace Element

* Below the detection limit

2.2 Gross characterization of fertilizer samples

Solutions (1g/L) of each P-fertilizer were prepared with distilled water. pH (Adwa AD 1000 pH/mV & Temp. meter) and conductivity (WTW Cond 330i) were then measured. The solutions were filtered through a 0.45 μ m Nylon filter in order to analyze the major dissolved anions (PO_4^{3-} , Cl^- , SO_4^{2-} and NO_3^-) by ion chromatography (Shimadzu Shim-pack IC-A3). Concentrations of K^+ and Na^+ were determined using a Biotech engineering Management Co. Ltd flame photometer (AFP 100). PO_4^{3-} , SO_4^{2-} and K^+ were reported as P_2O_5 , SO_3 and K_2O respectively. The residue on the filter was dried at room temperature and analyzed by X-ray diffraction.

2.3 Nature of heavy metal bearing phases

X-ray diffraction analyses were carried out using a D8 Bruker diffractometer. The collected diffractograms were analyzed using the EVA software coupled to powder diffraction files provided by the interactive center for diffraction data ICDD. The various chemical groups in P-fertilizers were identified using Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR, 6300 JASCO) in transmission mode. Pellets were prepared by mixing a 1% (w/w) of the P-fertilizer with KBr. The spectra were recorded in the 4000-400 cm^{-1} range at 4 cm^{-1} resolution.

2.4 Quantitative assessment of heavy metal contaminants

A pre-calibrated Thermo Scientific Niton XL2 X-Ray tube-based X-Ray fluorescence (XRF) analyzer was used in the bulk mode to measure the levels of Sb, Pd, Ag, Mo, Nb, Zr, Bi, and Mn. Cd, Zn, Pb, Fe, Cu and Ca were determined by atomic absorption spectrometry (AAS) using a Rayleigh WXF-210 AA Spectrophotometer and WF-10A Autosampler. A 3 g amount of P-fertilizer was dissolved in aqua regia formed by freshly mixing 21 mL of hydrochloric acid (HCl , 12 mol.L^{-1}) with 7 mL of nitric acid (HNO_3 , 14 mol.L^{-1}) (ISO 11466:1995). After 16 hours at room temperature, the mixture was digested at 120°C for 2 hours. After cooling, 10 mL of diluted nitric acid (HNO_3 , 0.5 mol.L^{-1}) were added, and the digested samples were filtered through a 0.45 μ m PTFE filter (Millipore). The filtrate was diluted to 50 mL with nitric acid 0.5 mol.L^{-1} and stored at 4°C before analysis. The instrument was calibrated using manually prepared standard solutions of each metal. Blanks for AAS analysis were prepared from HCl and HNO_3 (3:1) solution by using the same digestion protocol as with P-Fertilizer. Digestions were carried out per batch of 12, which includes 3 replicates of each sample and 3 blanks.

2.5 Statistical analysis

All the data reported represent an average of three replicates with standard deviation. XL-STAT software (Version 2009.3.02) was used to treat the data. The observations and correlations between all parameters were tested using Principal Component Analysis (PCA), Pearson (n) type.

3 Results and discussion

3.1 Mineral phases and functional groups

Archerite or biphosphammite ((NH₄,K)H₂PO₄) was the dominant crystallized phase in potassium phosphate fertilizers, whereas urea phosphatic acid (CO(NH₂)₂(H₃PO₄)) was typical of the urea phosphate group. Anhydrite (CaSO₄), chlorapatite (Ca₁₀(PO₄)₆Cl₂), and minor amounts of Cadmium Lead Phosphate Hydroxide ((CdPb₉)(PO₄)₆(OH)₂) were found in the superphosphate group. In the case of NPK fertilizers, biphosphammite, syngenite (K₂Ca(SO₄)₂.H₂O), carnalite (KClMgCl₂.6H₂O), fluorapatite (Ca₁₀(PO₄)₆F₂), niter mineral (KNO₃) were distinguished with traces of urea (CO(NH₂)₂) (Typical DRX diffractograms are shown in Supporting Information). Glauconite ((K,Na)(Fe,Al,Mg)₂(Si,Al)₄O₁₀(OH)₂) was identified in one sample of P-fertilizers. Likewise, montmorillonite was recognized in three NPK fertilizers. Such clay minerals are usually found disseminated in calcareous rocks, and may occur as impurities in the stockpiles of raw materials.

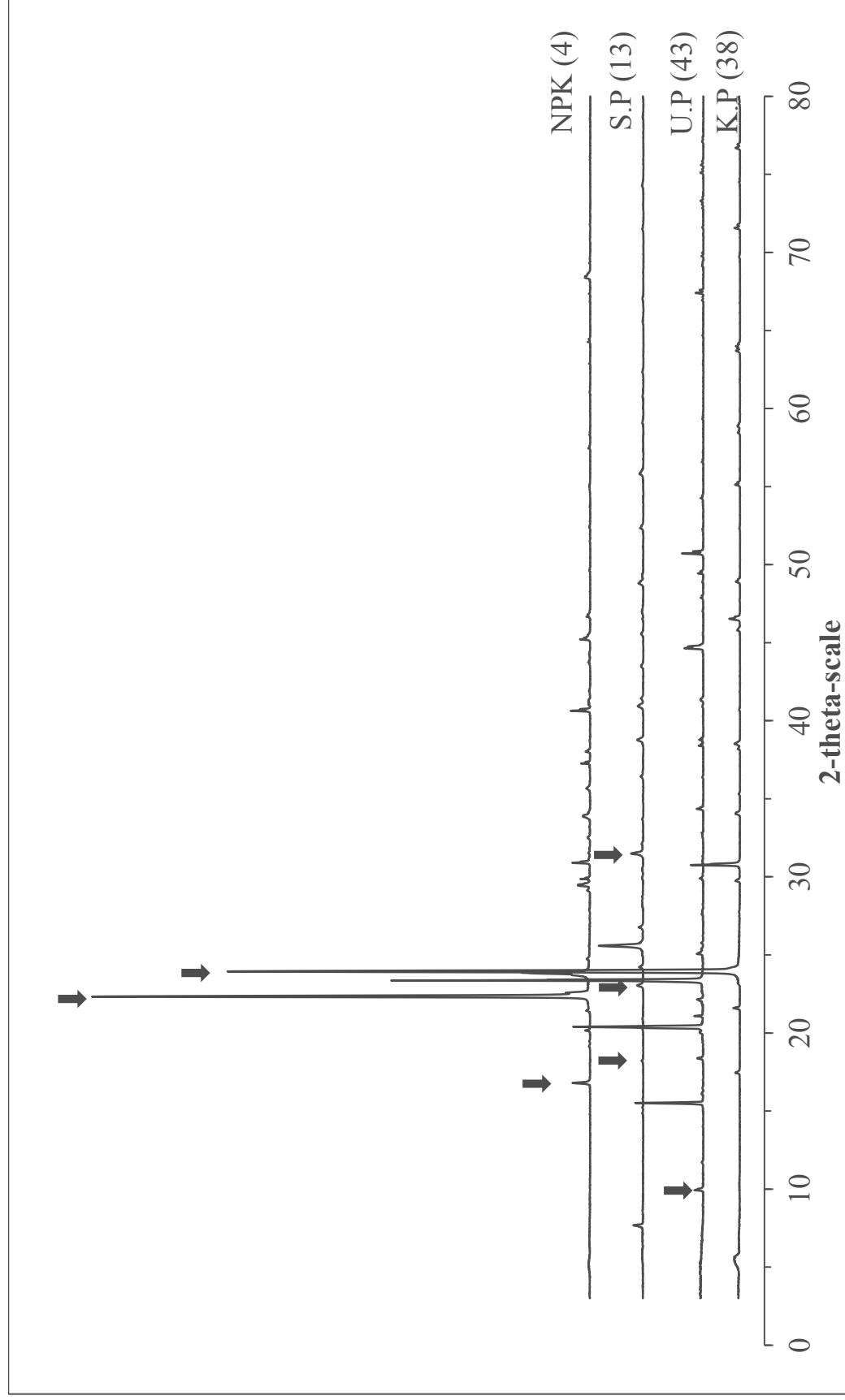


Figure S1 Typical diffractograms of Potassium Phosphate (K.P; sample 38), Urea-Phosphate (U.P; sample 43), Superphosphate (S.P; sample 13) and NPK (sample 4). The black arrows correspond to the 2-theta value of 23.952 on the U.P, 18.211, 23.057 and 31.495 on the S.P and 16.681 and 22.32 on the N.P.K.

If fluorapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) is a likely residue of the initial phosphate ore [4, 30], the other mineral phases are classically formed during processing. Thus, the assemblage archerite, biphosphammite, syngenite, halite, and calcite, has previously been reported in the literature in P-fertilizers [31]. Syngenite in NPK fertilizers is often found inter-grown and enclosed within the biphosphammite phase [32], which itself results from the loss of one ammonia from phosphammite $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Gypsum obtained as by-product during the preparation of phosphoric acid upon addition of sulfuric acid to the phosphate rocks, is transformed to anhydrite and calcium hydrogen phosphate hydrate ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) in the superphosphate under high temperature [33]. These components were previously reported by Makweba and Holm [8] as the main phosphate compounds present in superphosphate fertilizer. Calcium carbonate has also been reported to occur in rock phosphate [34].

Infrared spectra reveal a predominant band around 1100 cm^{-1} in superphosphate but less intense in urea phosphate, NPK and potassium phosphate, attributed to the P-O symmetric stretching vibrations in the PO_4 group [34-35] (See figure S2 in Supporting Information). The absorbance bands at $680\text{-}610 \text{ cm}^{-1}$ in superphosphate and NPK samples, and $840\text{-}810 \text{ cm}^{-1}$ in urea phosphate, NPK and potassium phosphate samples, confirm the presence of sulfate and nitrate groups (S-O and N-O vibrations, respectively) [35, 36]. The N-H bond in ammonium ion is characterized by a strong peak at 1390 cm^{-1} [36, 37]. The band at $1650\text{-}1590 \text{ cm}^{-1}$ in urea phosphate, potassium phosphate and NPK, is also attributed to the presence of N-H bond. The broad absorption band around $3000\text{-}2850 \text{ cm}^{-1}$ suggests the presence of C-H bond in potassium phosphate and urea phosphate fertilizers [38]. Hydroxyl groups and adsorbed water are identified in the $3670\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$ region in all the samples [34, 39]. Such hydration is also observed in the NPK samples at the wavelength number of 3169 cm^{-1} [34]. N-H, S-O and N-O bonds were identified in 85%, 77% and 70% of P-fertilizers, respectively.

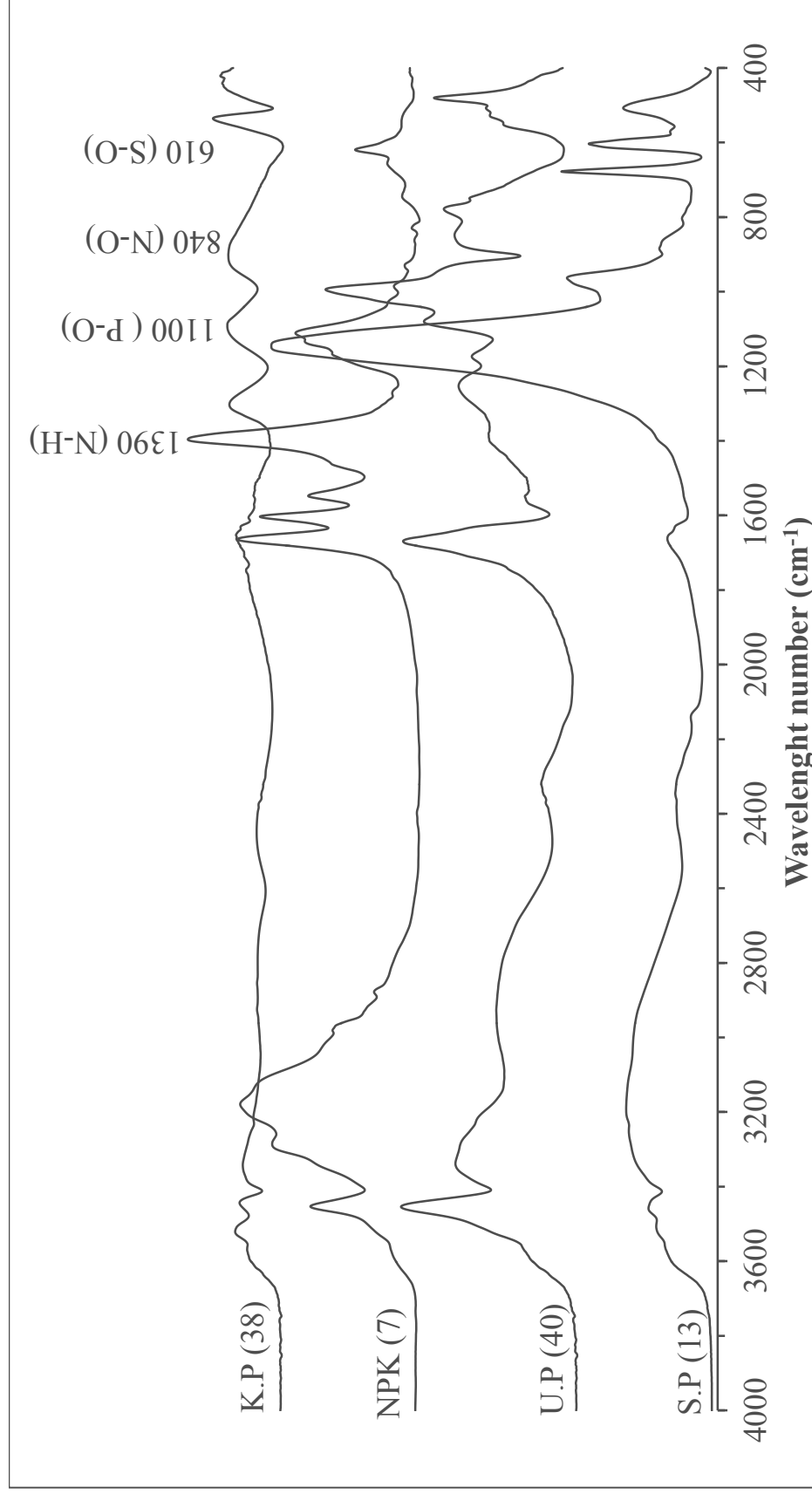


Figure S2 Typical infrared spectra of Superphosphate (S.P; sample 13), Urea-phosphate (U.P; sample 40), NPK fertilizers (sample 7) and Potassium Phosphate (K.P; sample 38)

In the FTIR transmission mode, the absorbance intensity is directly proportional to the abundance of a given chemical bond. Hence, the intensity ratios of the typical bands characterizing the P-fertilizers may provide valuable insights into the relative abundance of the chemical groups considered. Fig. 1 presents the cumulative frequency for P-fertilizers as a function of the band intensity ratios I_{P-O}/I_{N-O} , I_{P-O}/I_{S-O} and I_{P-O}/I_{N-H} . About 73% of the samples yielded I_{P-O}/I_{N-H} ratios <1 , which means that the P-O bond is then less abundant than the N-H bond. In 77% and 70% of the samples, P-O bonds were more frequent than S-O and N-O bonds, respectively (I_{P-O}/I_{N-O} and I_{P-O}/I_{S-O} greater than 1). This implies that phosphate is more abundant than nitrate and sulfate, and that nitrogen is mainly present as ammonium and not as nitrate in P-fertilizers.

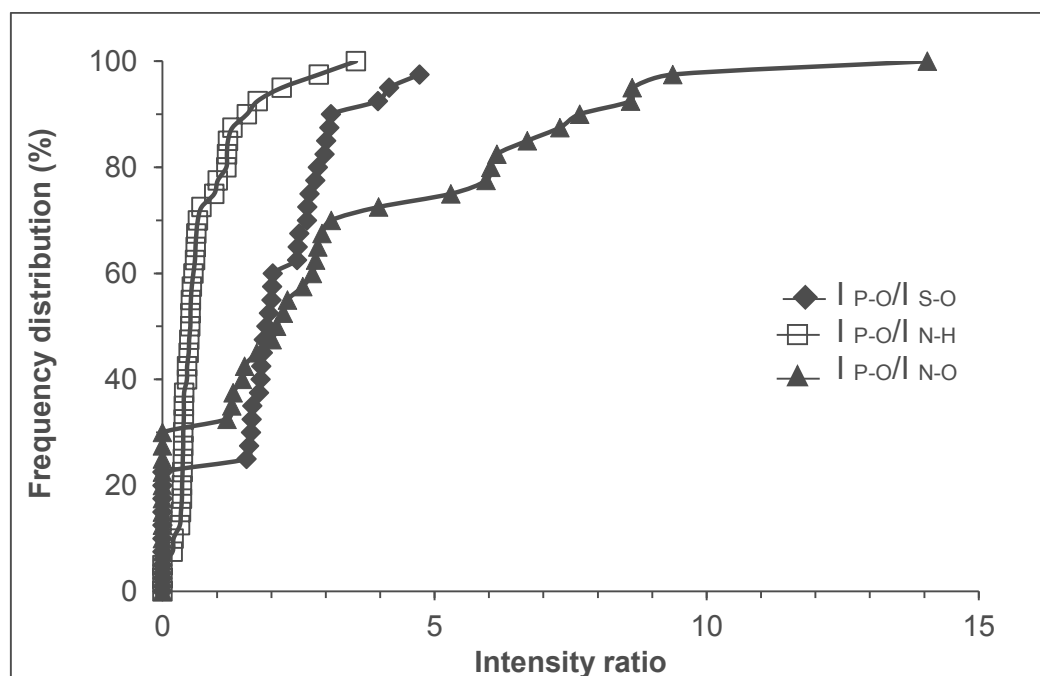


Fig. 1 Frequency distribution of the Intensity ratio of the typical functional groups (I_{P-O}/I_{S-O} , I_{P-O}/I_{N-H} and I_{P-O}/I_{N-O}).

3.2 Geochemical characteristics of fertilizers

The main chemical characteristics and amounts of major components and of trace metals within the P-fertilizers investigated are listed in Table 1. The pH of P-fertilizer solutions ranged from 2.2 to 8 whereas the conductivity was measured between 0.41 and 5.55 mS/cm. However, the pH measured for a solution of a given fertilizer group displayed no significant variation. Urea phosphate yields the lowest pH values (2.27 ± 0.05) among the fertilizer solutions but not the greatest conductivity (1.78 ± 0.19 mS/cm). Potassium phosphate and urea phosphate lead to the highest conductivity because of their solubility in water. Such solubility can be related to the

origin of the phosphate ore and to the type of fertilizer process. It is worth noting that the electrical conductivity of P-fertilizer solutions varies within a wide range for each fertilizer group. This suggests that the solubilization mechanism of fertilizers within a given group may drastically change, which is of great interest to properly understand the migration of trace metals in soils when released from fertilizers.

The level of P_2O_5 ranged from 2.82 to 53%, that of SO_3 between 0 and 34%, Cl^- between 0 and 0.02%, K_2O between 0 and 45%, NO_3^- between 0 and 7.2% and Na^+ between 0.15 and 3.8%. The highest concentrations in P_2O_5 were found in superphosphate, potassium phosphate and urea phosphate, whereas the lowest P-level was found in NPK.

Among toxic metals, cadmium has received a considerable attention and several studies focused on Cd availability since it can be easily absorbed by plants. Cadmium concentrations ranged from 0.62 to 9.43 mg/kg with a mean value of 3.16 mg/kg, superphosphate showing the highest concentration in cadmium, i.e. 9.43 mg Cd/kg (Table 1). Such values lie within the range reported for Cd in phosphate rocks (0.1-60 mg/kg) [6, 40] and in phosphate fertilizers (0.1-170 mg/kg) [2, 27, 41]. If the Cd level is normalized to the P concentration in the fertilizer, the average Cd concentration in our fertilizers is 76.53 mg/kg-P. The Cd concentrations in Potassium Phosphate and Urea phosphate were below 22 mg Cd/kg-P, whereas Cd in superphosphate (58.71 ± 19.3 mg Cd/kg-P) was much higher in comparison with literature data [42]. 65% of the samples exceeded the Cd concentration limit set by the German Fertilizer Ordinance (21.2 mg Cd/kg-P) [10, 13] (Fig. 2).

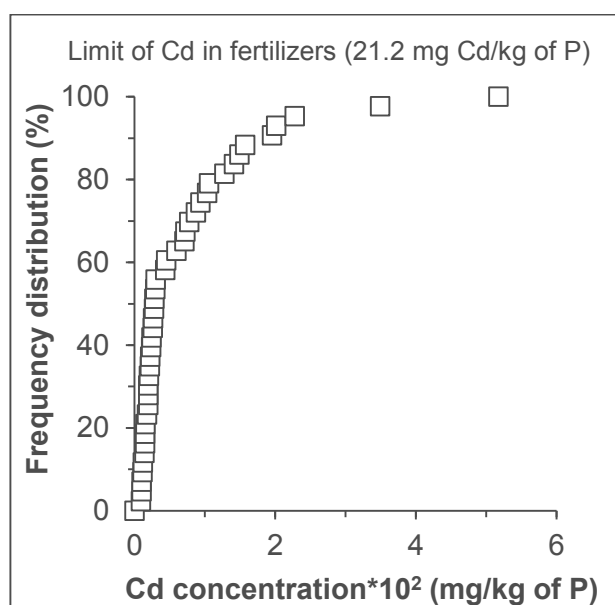


Fig. 2 Frequency distribution of cadmium in P-fertilizer samples (mg Cd/kg of P).

According to the literature, Cd should be essentially associated with tricalcium phosphate [43]. In the present study, however, a fairly good correlation was found between Cd and SO_4^{2-} in superphosphate, NPK-fertilizers, urea phosphate and potassium phosphate. The substitution of Ca with Cd results from a Cd^{2+} ionic radius (0.109 nm) similar to that of Ca^{2+} (0.114 nm), thus leading to a Cd-P or Cd-S bond and the formation of $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$ and/or CdSO_4 within the fertilizers [44]. The relationship between Cd and sulfate is conditioned to the presence of high sulfate contents in the NPK group of higher pH (Table 1). Such result is reminiscent of Cd speciation studies in the roots of barley and lettuce [44], showing that most of cadmium ions were bound to ligands containing SO_4^{2-} .

Lead was present in all fertilizer samples. The highest concentrations were measured in potassium phosphate and NPK samples with 16 ± 11 and 14 ± 9 mg Pb/kg, respectively. All the samples were below the limit of 150 mg Pb/kg (Fig. 3a) [13]. During the manufacturing process of P-fertilizer from phosphate rocks, the precipitation of phosphogypsum after sulfuric acid addition may capture Pb as insoluble lead sulfate (anglesite PbSO_4) [40]. Indeed, lead sulfate is barely soluble whereas lead phosphate solubility in water is found to increase with a decrease in pH to 4 [45]. Hence, during the manufacturing of phosphate fertilizer, if sulfate is present, it will compete with phosphate to precipitate lead. In contaminated soils, previous studies have shown that Pb can be stabilized by the addition of hydroxyapatite to form pyromorphite-like minerals ($\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$) where X can be replaced with OH, Cl or F. Hydroxyapatite may also fix Cd and Zn to lead to the formation of cadmium lead phosphate hydroxide ($\text{CdPb}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), or fluorapatite [25, 26]. Such mineral phases in the fertilizers are geochemically stable with reduced solubility allowing lead to accumulate in soil without being significantly absorbed by plants [24, 25, 40].

Essential trace elements for plants such as Zn, Cu, Fe, Mo, Mn and B are added to data sheets of the fertilizers as TE (Trace elements). Actually, most of the samples collected were not labelled as containing Zn, Cu, Fe and Ca (Table 1).

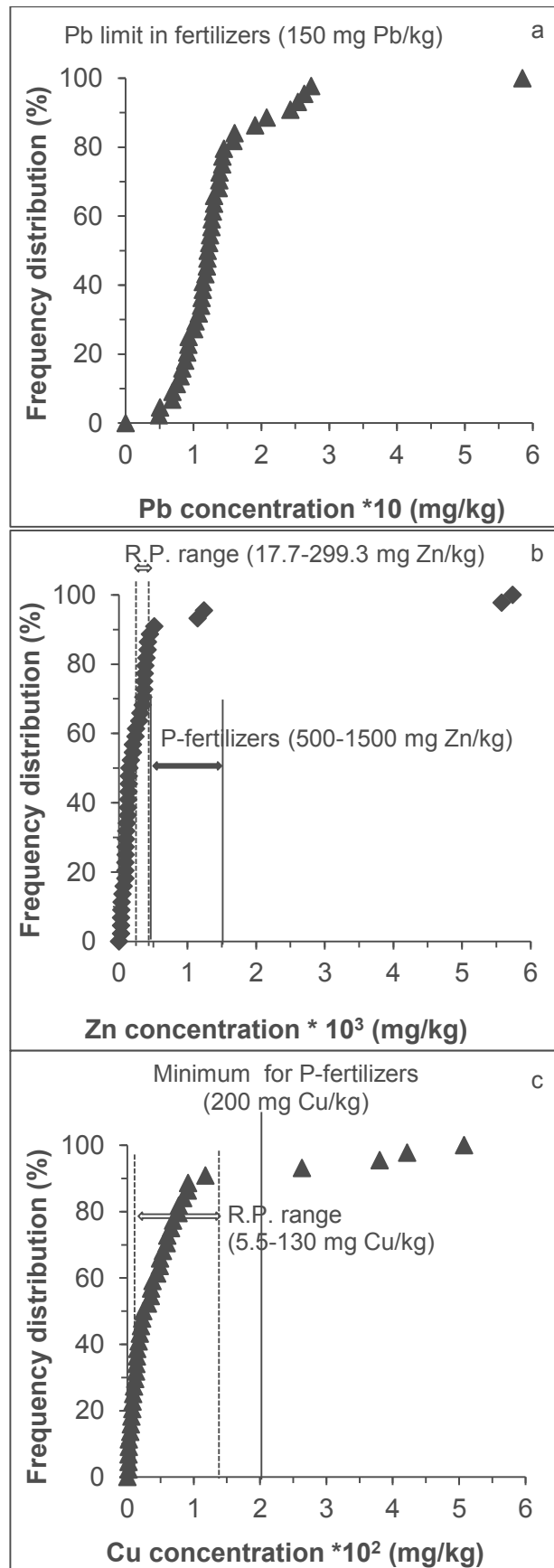


Fig. 3 Frequency distribution in P- fertilizer samples of: a) Lead, b) Zinc and c) Copper in (mg/kg).

The zinc concentrations in the P-fertilizers ranged from 29 mg/kg to 5735 mg/kg with a mean value of 496 mg/kg. Expressed on P-basis, the overall mean in P-fertilizers was 8574 mg Zn/kg-P. Zinc showed elevated values in NPK-fertilizers with a mean value of 541 mg/kg. The average zinc levels in urea phosphate, superphosphate and potassium phosphate were 141 ± 1 , 588 ± 160 and 250 ± 63 mg Zn/kg, respectively. Such range is consistent with previous reports for phosphate rock (17.7-299.3 mg Zn/kg) [40] and for phosphate fertilizers (50-1500 mg Zn/kg) (Fig. 3b) [11]. Only 2 NPK-fertilizers had Zn concentrations above the limit value of 5000 mg/kg [13]. Since both zinc and cadmium belong to the same group in the periodic system of elements and have a similar nuclear structure and ionic radius, they may compete in the soil for similar binding sites [11, 46]. On the other hand, some authors have demonstrated an antagonistic interaction for Cd and Zn uptake and translocation in plants, an increase in Zn uptake mitigating Cd accumulation in crops [47].

Copper, like Zn, showed elevated values in NPK-fertilizers and potassium phosphate samples with a mean value of 74.86 ± 118 and 30.63 ± 40.3 mg Cu/kg respectively. The average value for Cu, i.e. 66.6 ± 111 mg Cu/kg, is lower than the worldwide range for rock phosphate (5.5-130 mg/kg); only 4 NPK-fertilizer samples gave a higher concentration. 92% of the samples had a concentration below 200 mg Cu/kg (Fig. 3c), the minimum concentration for Cu in Germany and all the samples remained below the limit of 900 mg/kg set for agricultural fertilizers in the same country [13].

Iron and calcium were present in abundance in NPK-fertilizers and superphosphate where they reached 1.7 and 1.4 g Fe/kg and 9.2 and 149.3 g Ca/kg respectively for the two kinds of phosphate fertilizers mentioned above. 65% of the tested products displayed Fe concentrations above 500 mg Fe/kg and all the samples except one NPK-fertilizer had the Fe concentrations below the minimum of 10 g Fe/kg defined by the German Fertilizer Ordinance for agricultural products [13].

The standard deviations exceeded the mean average of Cu in NPK-fertilizers and potassium phosphate samples. The high standard deviations found for all the investigated elements even within a single group of fertilizers result on the one hand from the various origins of phosphate rocks, and on the other hand, from the type of processes used in P-fertilizers manufacturing [13].

The residue on the filter during the preparation of the 1 g/L solution of fertilizer was examined by XRD. The non-dissolved particles correspond mainly to apatite and quartz in the

superphosphate samples. The geological origin of phosphate rocks explains the presence of apatite, quartz, montmorillonite, dolomite, fluorapatite, etc. [48].

The concentrations of phosphate, sulfate, cadmium, lead and the relative abundance of copper and zinc in fertilizer samples are given in Fig. 4. The cadmium distribution in P-fertilizers clearly reaches the highest levels (around 9 mg/kg) when the proportion of sulfate increases in the fertilizers. In the absence of sulfate, cadmium remains fluctuant between 1.5 and 2 mg/kg (Fig. 4a), which is not the case for lead (Fig. 4b). This suggests that cadmium is mainly associated with sulfate and in less important amounts with phosphate when sulfate is absent or negligible. However, no direct proportional relationship between cadmium and sulfate can be inferred which actually reflects the various geochemical backgrounds of the fertilizers. The content in lead is between 10 and 15 mg/kg in fertilizers without revealing a specific affinity for either sulfate or phosphate. The behaviors of copper and zinc are similar to that of lead. The relative abundances of copper and zinc do not show a clear relation with one or another component of the fertilizers, even though the highest relative amounts of copper and zinc were observed in fertilizers of high sulfate contents and the lowest amounts in fertilizers with less or negligible sulfate contents (Fig. 4c).

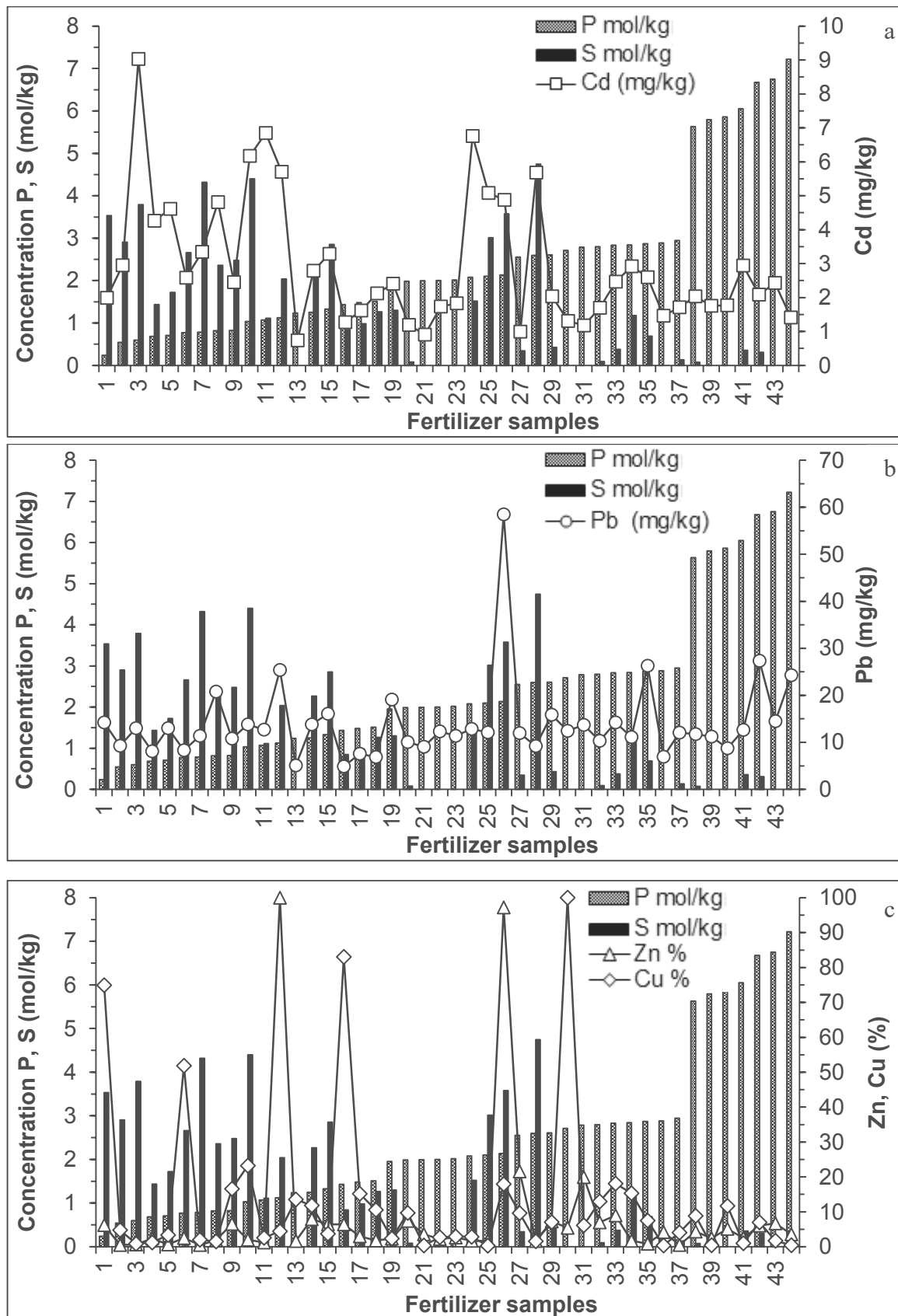


Fig. 4 a) P, S, and Cd, b) P, S and Pb, c) P, S, Zn (%) and Cu (%) in fertilizer samples.

The results of the Principal Component Analysis (PCA) showed that the eigenvalues of the first three components explain 60.5% of the total variance correlation (Fig. 5). Cadmium was positively correlated to sulfate (0.516) and calcium (0.705), which is in agreement with what was previously described in Fig. 4. Hence, cadmium is essentially entrapped in the calcium sulfate phases of the fertilizers (Fig. 5). Another positive correlation was found between Zn and Pb with $R=0.590$ (Fig. 5, Table 2). Sb, Ag, Pd, Nb, Mo were strongly correlated to each other (R between 0.86 and 0.44) and to a lesser extent with P_2O_5 (R between 0.48 and 0.24) (Table 2). Such result is consistent with Boyle and Jonasson investigation [49] on the geochemistry of antimony (Sb), which revealed that Sb can be considered as an indicator of phosphorous and is geochemically associated to Ag, P, Bi, Nb and Mo.

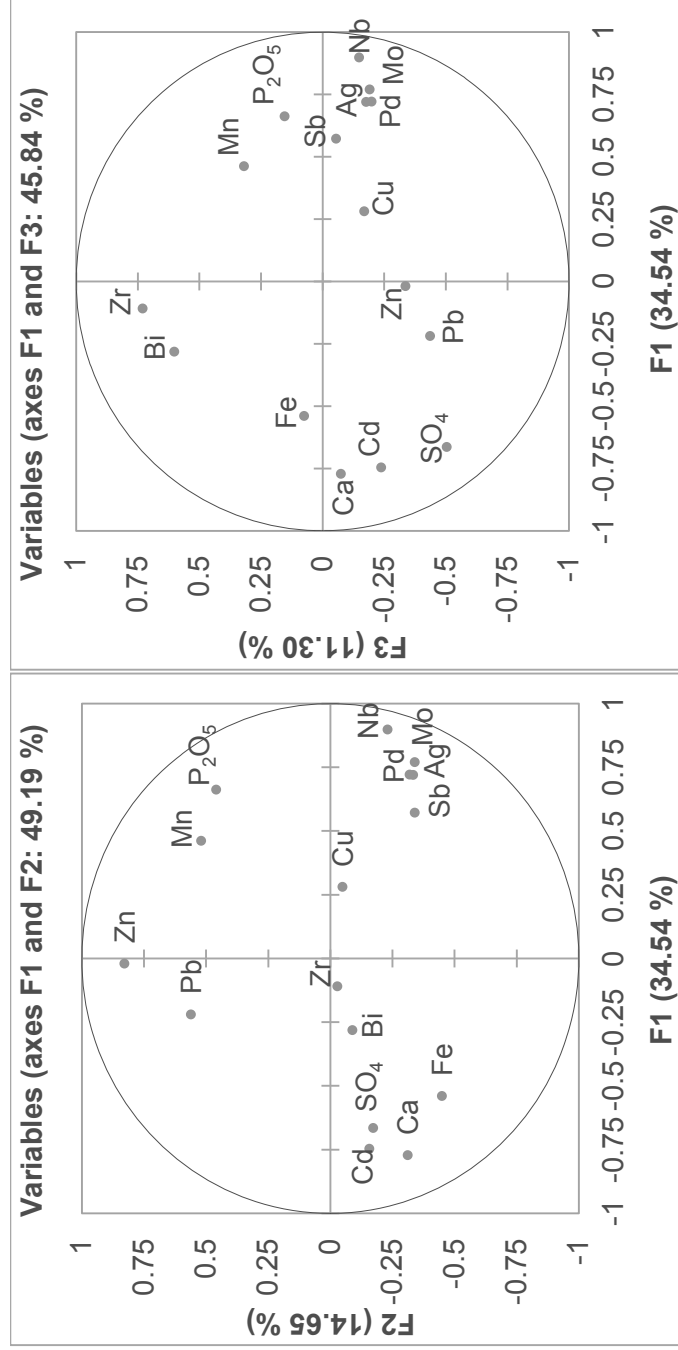


Fig. 5 Pearson correlation of all compounds in NPK fertilizer.

Table 2 Pearson correlation of all compounds in NPK fertilizers

	Sb	Pd	Ag	Mo	Nb	Zr	Bi	Zn	Cu	Fe	Mn	Pb	Cd	Ca	P ₂ O ₅	SO ₄
Sb	1															
Pd	0.474	1														
Ag	0.499	0.528	1													
Mo	0.438	0.605	0.856	1												
Nb	0.580	0.730	0.739	0.808	1											
Zr	-0.190	-0.187	-0.045	-0.050	-0.179	1										
Bi	0.070	-0.320	-0.194	-0.221	-0.364	0.383	1									
Zn	-0.288	-0.191	-0.145	-0.160	-0.100	-0.202	-0.205	1								
Cu	-0.010	0.215	0.119	0.335	0.205	-0.119	-0.116	-0.046	1							
Fe	-0.413	-0.171	-0.325	-0.249	-0.305	0.156	-0.044	-0.340	-0.092	1						
Mn	0.005	0.161	0.062	0.094	0.251	0.044	-0.135	0.350	0.149	-0.252	1					
Pb	-0.206	-0.273	-0.071	-0.150	-0.261	-0.022	-0.103	0.590	-0.098	-0.229	-0.173	1				
Cd	-0.208	-0.480	-0.397	-0.434	-0.586	-0.128	0.173	-0.030	-0.245	0.360	-0.495	0.198	1			
Ca	-0.316	-0.444	-0.367	-0.396	-0.557	0.051	0.201	-0.150	-0.215	0.591	-0.400	0.071	0.705	1		
P ₂ O ₅	0.291	0.242	0.243	0.329	0.476	-0.069	-0.113	0.191	0.138	-0.477	0.576	0.083	-0.459	-0.630	1	
SO ₄	-0.256	-0.341	-0.335	-0.358	-0.534	-0.260	-0.008	0.017	0.038	0.367	-0.502	0.241	0.516	0.502	-0.602	1

3.3 Input of trace metals in agriculture soils

Whatever the guidelines used for describing and characterizing soils, the levels of metals in soils will either fall within the guideline ranges or outside. The metal contents in some studied soils of eastern and southern Mediterranean countries are drastically different (Table 3). For example, in Lebanese soils, the cadmium level is higher than that found in Canadian soil quality guidelines unlike the levels of copper and lead. Therefore, such data must be discussed separately taking into account the external inputs of metals to the soil, and especially fertilizers inputs that represent the most important source of metals.

Table 3 Trace metals in soils from eastern and southern Mediterranean countries (mg/kg).

	Cd	Zn	Pb	Cu	Cr	
Dubai	0.17-1.01	3.34-170.27	6.92-2784	0.82-65.9		[53]
Lebanon	0.28-2.8		11.3-22.9	25.3-54.2		[54]
Egypt	12-16	36-41	46-79	28-29		[55]
Iraq	11-41		29-183			[56]
Iran	0.11-8.68	50.2-1510.3	7.2-319.3	15.4-84	67-116	[57]
Syria		46-293	<5-108	16-97	12-116	[58]
Tunisia	16.5	3337.6	676			[59]
Morocco	0.52-0.81	261.98-791.63	38.36-67.14	66.7		[60]
Algeria	0.01-14.15	4.7-258.8	3.1-823.7	0.2-132.1	7.4-111.5	[61]

The average applications of phosphate fertilizer are 34 kg/ha/year in Asia, 133 kg/ha/year in India, 600 kg/ha/year in Saudi Arabia, which is actually much lower than the 1860 kg/ha/year applied in Lebanon [47, 50, 51]. Knowing the amounts of trace metals in fertilizers and the average amendment per year of P-Fertilizer, the input of trace metals from P-fertilizers into agricultural soils may be estimated.

The P-Fertilizer annual amendment in the eastern Mediterranean countries usually ranges between 20 and 60 kg-P/hectare. Such values fluctuate according to agricultural practice, soil pH and soil humidity. The common practice applies high levels of P-amendment since soil pH is alkaline under moderate to dry climate. In Table 4, the estimated range of inputs in Cd, Pb, Zn and Cu are given on P-basis per year. According to the fertilizer used, the supply in cadmium may reach 31 g/ha/year when 60 kg of P are applied. Lead input varies between 0.95 to 100 g/ha/year, zinc between 6.6 to 5257 g/ha/year and copper between 0.18 to 26130 g/ha/year.

Table 4 Estimated range of inputs in Cu, Pb, Zn and Cd (g/ha/year) in agricultural soil

Minimum application of 20 kg P/ha/year				
	Input of Cu	Input of Pb	Input of Zn	Input of Cd
(g/ha/year)				
Min/max	0.185/871	0.95/32.59	6.6/1752.4	0.183/10.34
Maximum application of 60 kg P/ha/year				
	Input of Cu	Input of Pb	Input of Zn	Input of Cd
(g/ha/year)				
Min/max	0.56/26130	2.84/98	19.8/5257.2	0.54/31

Based on those values, the average input of metals to agricultural soils of eastern Mediterranean countries from phosphate fertilizers may be estimated to 6 g Cd/ha/year, 26 g Pb/ha/year, 922 g Zn/ha/year and 124 g Cu/ha/year. Such levels are higher than the average values reported for the European countries (e.g. 1.6 g Cd/ha, 1 g Pb/ha and 43.1 g Zn/ha). However, such metal inputs are much lower than the maximum limits set in Brazil and in the United Kingdom [52]. Nevertheless, such estimates and comparisons remain approximations since the metal accumulation in agricultural soil depends not only on the total addition of metal but also on soil pH, humidity and soil compounds. Therefore, in arid regions where soil pH is mostly alkaline, the metal inputs estimated seem to be relatively high even if they remain comparable and lower than the limits established for some countries.

4 Conclusions

According to the origin of the phosphate rock and to the fertilizer manufacturing process, the trace metal concentrations may significantly vary within a given type of fertilizer. Cadmium showed the highest concentration in superphosphate, whereas lead, copper and zinc were more abundant in potassium phosphate and NPK-fertilizers. Phosphate minerals were found to be the major trace metal bearing phases for cadmium, molybdenum, antimony, niobium and palladium. Another strong correlation was found between calcium, cadmium and sulfate.

The application of fertilizers is by far the most significant source of trace elements in cropland soils. However, during P-Fertilizer production, metals will precipitate in the less soluble phases, which may mitigate the impact of metal inputs. In Eastern Mediterranean countries, the presence of alkaline soils combined with the arid to semi-arid climate, facilitates the accumulation of trace metals. Therefore, careful attention must be paid when setting the limits

for trace metal inputs in soils, which should be based not only on the amount of metals in P-fertilizers but also on the accumulation potential of metals in soils.

References

- [1] A.S. Knox, D.I. Kaplan, M.H. Paller, Phosphate sources and their suitability for remediation of contaminated soils, *Sci. Total Environ.* **2006**, *357*, 271–279.
- [2] L. Giuffré, S. Ratto, L. Marbán, Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina, *Sci. Total Environ.* **1997**, *204*, 245–250.
- [3] M. Rentería-Villalobos, I. Vioque, J. Mantero, G. Manjón, Radiological, chemical and morphological characterizations of phosphate rock and phosphogypsum from phosphoric acid factories in SW Spain, *J. Hazard. Mater.* **2010**, *181*, 193–203.
- [4] C. Roselli, D. Desideri, M.A. Meli, Radiological characterization of phosphate fertilizers: Comparison between alpha and gamma spectrometry, *Microchem. J.* **2009**, *91*, 181–186.
- [5] P.M. Rutherford, M.J. Dudas, R.A. Samek, Environmental impacts of phosphogypsum, *Sci. Total Environ.* **1994**, *149*, 1–38.
- [6] I. Aydin, F. Aydin, A. Saydut, E.G. Bakirdere, C. Hamamci, Hazardous metal geochemistry of sedimentary phosphate rock used for fertilizer (Mazıdag, SE Anatolia, Turkey), *Microchem. J.* **2010**, *96*, 247–251.
- [7] R. Shahack-Gross, F. Berna, P. Karkanis, S. Weiner, Bat guano and preservation of archaeological remains in cave sites, *J. Archaeol. Sci.* **2004**, *31*, 1259–1272.
- [8] M.M. Makweba, E. Holm, The natural radioactivity of the rock phosphates, phosphatic products and their environmental implications, *Sci. Total Environ.* **1993**, *133*, 99–110.
- [9] W. Tang, B. Shan, H. Zhang, Phosphorus buildup and release risk associated with agricultural intensification in the estuarine sediments of Chaohu Lake Valley, Eastern China, *Clean- Soil, Air, Water*, **2010**, *38* (4), 336–343.
- [10] W. Jiao, W. Chen, A.C. Chang, A.L. Page, Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review, *Environ. Pollut.* **2012**, *168*, 44–53.
- [11] R. Lambert, C. Grant, S. Sauvé, Cadmium and zinc in soil solution extracts following the application of phosphate fertilizers, *Sci. Total Environ.* **2007**, *378*, 293–305.

- [12] G. Nziguheba, E. Smolders, Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries, *Sci. Total Environ.* **2008**, *390*, 53–57.
- [13] S. Kratz, J. Schick, E. Schnug, Trace elements in rock phosphates and P containing mineral and organo-mineral fertilizers sold in Germany, *Sci. Total Environ.* **2015**, In press. [doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.046](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.046).
- [14] A.S. Abdel-Haleem, A. Sroor, S.M. El-Bahi, E. Zohny, Heavy metals and rare earth elements in phosphate fertilizer components using instrumental neutron activation analysis, *Appl. Radiat. Isot.* **2001**, *55*, 569–573.
- [15] A.L. Pérez, K.A. Anderson, DGT estimates cadmium accumulation in wheat and potato from phosphate fertilizer applications, *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 5096–5103.
- [16] E. Schnug, B.G. Lottermoser, Fertilizer-derived Uranium and its threat to human health, *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 2433–2434.
- [17] N. Yamaguchi, A. Kawasaki, I. Iiyama, Distribution of uranium in soil components of agricultural fields after long-term application of phosphate fertilizers, *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 1383–1390.
- [18] E. Belon, M. Boisson, I.Z. Deportes, T.K. Eglin, I. Feix, A.O. Bispo, I. Galsomies, S. Leblond, C.R. Guellier, An inventory of trace elements inputs to French agricultural soils, *Sci. Total Environ.* **2012**, *439*, 87–95.
- [19] X. Wang, T. Sato, B. Xing, S. Tao, Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish, *Sci. Total Environ.* **2005**, *350*, 28–37.
- [20] D. Lin, Y. Ouyang, C.H. Huang, D.Y. Huang, Characterization of heavy metals from banana farming soils, *CLEAN - Soil, Air, Water* **2010**, *38* (5-6), 430–436.
- [21] A. Takeda, H. Tsukada, Y. Takaku, S. Hisamatsu, M. Nanzyo, Accumulation of uranium derived from long-term fertilizer applications in a cultivated Andisol, *Sci. Total Environ.* **2006**, *367*, 924–931.
- [22] U. Thawornchaisit, C. Polprasert, Evaluation of phosphate fertilizers for the stabilization of cadmium in highly contaminated soils, *J. Hazard. Mater.* **2009**, *165*, 1109–1113.
- [23] M. Zhang, J. Pu, Mineral materials as feasible amendments to stabilize heavy metals in polluted urban soils, *J. Environ. Sci.* **2011**, *23* (4), 607–615.

- [24] X. Cao, L.Q. Ma, D.R. Rhue, C.S. Appel, Mechanisms of lead, copper, and zinc retention by phosphate rock, *Environ. Pollut.* **2004**, *131*, 435–444.
- [25] R.X. Cao, L.Q. Ma, M. Chen, S.P. Singh, W.G. Harris, Phosphate-induced metal immobilization in a contaminated site, *Environ. Pollut.* **2003**, *122*, 19–28.
- [26] X. Cao, A. Wahbi, L. Ma, B. Li, Y. Yang, Immobilization of Zn, Cu, and Pb in contaminated soils using phosphate rock and phosphoric acid, *J. Hazard. Mater.* **2009**, *164*, 555–564.
- [27] A.A. Abdelhafez, H.H. Abbas, R.S. Abd-El-Aal, N.F. Kandil, J. Li, W. Mahmoud, Environmental and health impacts of successive mineral fertilization in Egypt, *Clean- Soil, Air, Water* **2012**, *40 (4)*, 356–363.
- [28] O. Dahl, R. Pöykiö, H. Nurmesniemi, Concentrations of heavy metals in fly ash from a coal-fired power plant with respect to the Finnish limit value, *J. Mater. Cycles Waste Manag.* **2008**, *10*, 87–92.
- [29] H. Weigand, M. Bertau, W. Hübner, F. Bohndick, A. Bruckert, RecoPhos : Full-scale fertilizer production from sewage sludge ash, *Waste Manag.* **2013**, *33*, 540–544.
- [30] B. Hajem, K. Djebali, A. M'nif, Modeling and optimization of fluoride and cadmium trapping in phosphogypsum using design methodology, *CLEAN - Soil, Air, Water* **2010**, *38 (9)*, 859–864.
- [31] P.J. Bridge, Archerite, $(K, NH_4)H_2P_2O_4$, a new mineral from Madura, Western Australia, *Mineral. Mag.* **1977**, *41*, 33–35.
- [32] M.W. Pryce, Biphosphammite: a second occurrence, *Mineral. Mag.* **1972**, *38*, 965–967.
- [33] M. Singh, M. Garg, Making of anhydrite cement from waste gypsum, *Cem. Concr. Res.* **2000**, *30*, 571–577.
- [34] G. Jiang, Y. Liu, L. Huang, Q. Fu, Y. Deng, H. Hu, Mechanism of lead immobilization by oxalic acid-activated phosphate rocks, *J. Environ. Sci.* **2012**, *24 (5)*, 919–925.
- [35] M-H. Bernier, G.J. Levy, P. Fine, M. Borisover, Organic matter composition in soils irrigated with treated wastewater : FT-IR spectroscopic analysis of bulk soil samples, *Geoderma* **2013**, *209–210*, 233–240.
- [36] F.A. Miller, C.H. Wilkins, Infrared Spectra and Characteristic Frequencies of Inorganic Ions., *Anal. Chem.* **1952**, *24(8)*, 1253–1294.

- [37] R.A. Nyquist, R.O. Kagel, *Infrared Spectra of Inorganic Compounds (3800-45 cm⁻¹)*, **1971**, 4, 1–34.
- [38] M. Chiban, A. Soudani, F. Sinan, S. Tahrouch, M. Persin, Characterization and application of dried plants to remove heavy metals, nitrate, and phosphate ions from industrial wastewaters, *CLEAN - Soil, Air, Water* **2011**, 39 (4), 376–383.
- [39] S. Yalcin, The mechanism of heavy metal biosorption on green marine macroalga *Enteromorpha linza*, *Clean- Soil, Air, Water* **2014**, 42 (3), 251–259.
- [40] Sabiha-Javied, T. Mehmood, M.M. Chaudhry, M. Tufail, N. Irfan, Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan, *Microchem. J.* **2009**, 91, 94–99.
- [41] E. Gimeno-Garcia, V. Andreu, R. Boluda, Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils, *Environ. Pollut.* **1996**, 92 (1), 19–25.
- [42] D. Uprety, M. Hejzman, J. Szakova, E. Kunzova, P. Tlustos, Concentration of trace elements in arable soil after long-term application of organic and inorganic fertilizers, *Nutr. Cycl. Agroecosystems* **2009**, 85, 241–252.
- [43] B.R. Singh, K. Myhr, Cadmium uptake by barley as affected by Cd sources and pH levels., *Geoderma* **1998**, 84, 185–194.
- [44] M.F. Akhter, C.R. Omelon, R.A. Gordon, D. Moser, S.M. Macfie, Localization and chemical speciation of cadmium in the roots of barley and lettuce, *Environ. Exp. Bot.* **2014**, 100, 10–19.
- [45] S. Sauv e, M. McBride, W. Hendershot, Lead Phosphate Solubility in Water and Soil Suspensions, *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32 (3), 388–393.
- [46] N. K oleli, S. Eker, I. Cakmak, Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil, *Environ. Pollut.* **2004**, 131, 453–459.
- [47] D.K. Gupta, S. Chatterjee, S. Datta, V. Veer, C. Walther, Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals, *Chemosphere* **2014**, 108, 134–144.
- [48] P.M. Rutherford, M.J. Dudas, R.A. Samek, Environmental impacts of phosphogypsum, *Sci. Total Environ.* **1994**, 149, 1-38.

- [49] R.W. Boyle, I.R. Jonasson, The geochemistry of antimony and its use as an indicator element in geochemical prospecting, *J. Geochemical Explor.* **1984**, *20*, 223–302.
- [50] FAO, “Fertilizer use by crop,” in *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin*, Rome, Italy, **2006**.
- [51] N. Farajalla, M. Marktanner, L. Dagher, P. Zgheib, The National Economic, Environment and Development Studies (NEEDS) for Climate Change Project -Final Report, Issam Fares Institute for Public Policy and International Affairs - American University of Beirut, Beirut. **2010**.
- [52] F.T. Conceição, D.M. Bonotto, Radionuclides, heavy metals and fluorine incidence at Tapira phosphate rocks, Brazil, and their industrial (by) products, *Environ. Pollut.* **2006**, *139*, 232–243.
- [53] J. Aslam, S.A. Khan, S.H. Khan, Heavy metals contamination in roadside soil near different traffic signals in Dubai, Unites Arab Emirates, *J. Saudi Chem. Soc.* **2013**, *17*, 315–319.
- [54] H.J. Kanbar, N. Hanna, A.G. El-Samrani, A. Kobaissi, N. Harb, N. Amacha, Metal binding in soil cores and sediments in the vicinity of a dammed agricultural and industrial watershed, *Environ. Monit. Assess.* **2014**, *186 (12)*, 8793–8806.
- [55] Y. Al Naggar, E. Naiem, M. Mona, J. Giesy, A. Seif, Metals in agricultural soils and plants in Egypt, *Toxicol. Environ. Chem.* **2014**, *96 (5)*, 730–742.
- [56] R.H. Habib, S.M. Awadh, M. Muslim, Toxic heavy metals in soil and some plants in Beghdad, Iraq, *J. Al-Nahrain University* **2012**, *15 (2)*, 1–16.
- [57] A. Esmaeili, F. Moore, B. Keshavarzi, N. Jaafarzadeh, M. Kermani, M, A geochemical survey of heavy metals in agricultural and background soils of the Isfahan industrial zone, Iran, *Catena* **2014**, *121*, 88–98.
- [58] A. Möller, H.W. Müller, A. Abdullah, G. Abdelgawad, J. Utermann, Urban soil pollution in Damascus, Syria: concentrations and patterns of heavy metals in the soils of the Damascus Ghouta, *Geoderma* **2005**, *124*, 63–71.
- [59] G. Daldoul, R. Souissi, F. Souissi, N. Jemmali, H.K. Chakroun, Assessment and mobility of heavy metals in carbonated soils contaminated by old mine tailings in North Tunisia, *J. Afr. Earth Sci.* **2015**, *110*, 150–159.

- [60] Z. Fatna, C. Zakaria, M. Fatimaezzahra, M. Kawtar, N. Saber, Assessment of environmental quality in soil under wheat and vines in Bouznika-Benslimane region of Morocco. *Eur. Sci. J.* **2014**, *20* (24), 23–33.
- [61] S. Maas, R. Scheifler, M. Benslama, N. Crini, E. Lucot, Z. Brahmia, S. Benyacoub, P. Giraudoux, Spatial distribution of heavy metal concentrations in urban, suburban and agricultural soils in a Mediterranean city of Algeria, *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 2294–2301.

Récapitulatif

Dans la partie précédente (A), les apports en ETM par les engrais chimiques phosphatés au sol ont été évalués. La spéciation minéralogique des phases majeures constituantes des engrais phosphatés a été mise en évidence. Certains métaux, particulièrement le cadmium sont préférentiellement stockés dans la phase sulfate quand cette dernière existe dans les engrais. Cette étude a permis une évaluation quantitative et qualitative des apports en métaux lourds au sol sur une échelle annuelle. Cependant, une vue de plus près de la nature du sol s'avère nécessaire pour évaluer le devenir de ces métaux dans les sols fertilisés. Ainsi la suite de cette évaluation d'ajout des engrais correspond à caractériser le sol typique du pays et destiné aux activités agricoles (Annexe 1).

Le cadmium a été repéré dans la littérature comme étant l'ETM le plus toxique trouvé dans les sols agricoles suite à la fertilisation phosphatée. La présence du cadmium dans le sol vierge a été évaluée où son accumulation dans les strates de surfaces est plus importante qu'en strates profondes. Ainsi, le suivi du comportement de cet ETM dans les sols basiques sous un climat aride à semi-aride et son effet sur le développement des plantes dans un tel environnement feront l'objet de la deuxième partie des résultats. Dans cette partie (B), les différentes données trouvées sur les effets du cadmium, la compaction et les engrais phosphatés sur les caractères morphologiques et physiologiques des laitues, l'absorption du cadmium par les laitues et son transfert des racines à la partie aérienne des laitues et enfin sa migration dans les différents profils du sol alcalin ont fait l'objet d'une investigation présentée sous forme d'article.

Partie B

LACTUCA SATIVA GROWTH IN COMPACTED AND NON-COMPACTED SEMI-ARID ALKALINE SOIL UNDER PHOSPHATE FERTILIZER TREATMENTS AND CADMIUM CONTAMINATION

Résumé

La compaction du sol modifie d'une façon radicale les propriétés du sol d'où une modification de la croissance des plantes et la distribution des métaux dans le sol. La fertilisation phosphatée est généralement utilisée pour améliorer la production agricole, mais malheureusement, elle engendre des problèmes de contamination en éléments traces métalliques dans les sols et les plantes. L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de la compaction, de fertilisation phosphatée et de contamination par le cadmium du sol sur la croissance de *Lactuca sativa*.

La mobilité du cadmium dans le sol, son accumulation et son transfert aux laitues ont été aussi évalués. *Lactuca sativa* a été choisie comme plante modèle car elle est largement cultivée dans les sols argileux alcalins des pays Est de la Méditerranée. Deux densités de compaction (1,2 et 1,4 g/cm³), deux concentrations de P (0 et 109 mg P/kg) et deux taux de Cd (0 et 84 mg Cd/kg) ont été utilisés dans les 24 colonnes dans une combinaison factorielle. La compaction de sol a révélé d'une part une augmentation de la masse sèche des racines et des feuilles ainsi que de la surface foliaire et une diminution du contenu en chlorophylle et de l'activité du nitrate réductase (ANR) d'une autre part. Pour les deux densités de sol, la fertilisation phosphatée a amélioré la croissance des laitues en montrant une augmentation de la hauteur de la plante, la matière sèche, le nombre de feuilles et l'ANR tandis que le cadmium a élaboré l'effet contraire mais a augmenté la teneur en chlorophylle. Dans les sols contaminés en Cd, la compaction et la fertilisation phosphatée ont ralenti la migration du cadmium dans les colonnes de sol. L'absorption du Cd par les plantes a augmenté dans les sols contaminés en cadmium, l'accumulation de ce métal a été trouvée plus importante que dans celle des plantes cultivées dans les sols traités par P-Cd où l'absorption du Cd a été réduite dans les différentes parties de la plante.

***Lactuca sativa* growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination**

Abstract¹

Soil compaction is known to drastically modify soil properties and hence to affect both plant growth and metal distribution in the soil. Phosphate amendment is generally used to improve plant production but unfortunately it also gives rise to higher metal contamination in soils and plants. In this work, we aimed to study the effects of soil density, phosphate fertilization and cadmium contamination on the growth of *Lactuca sativa*. In particular, the migration of cadmium in the soil columns, its accumulation and translocation in lettuce were also examined. *Lactuca sativa* was selected as a model plant because it is widely cultivated in alkaline clay soils of eastern Mediterranean countries. Two levels of soil compaction (1.2 and 1.4 g.cm⁻³), two rates of P amendment (0 and 109 mg P.kg⁻¹), and two levels of Cd contamination (0 and 84 mg Cd.kg⁻¹) were used in 24 model columns with a factorial randomized block experimental design. Soil compaction increased considerably both leaf area and dry weight of roots and shoots, whereas both chlorophyll content and NRA decreased. For the two soil bulk densities, the phosphate fertilizer improved lettuce growth characterized by plant height, dry matter, leaf number and NRA, whereas Cd contamination altered those parameters and increased the chlorophyll content. In soils contaminated with cadmium, the combination of compaction and phosphate fertilization resulted in a significant decrease in Cd migration along the soil columns. Cd uptake by plants increased in Cd treated soils; its accumulation was found to be more important than in plants grown in P-Cd treated soil where Cd uptake was clearly reduced in shoots and roots.

Adapté de la forme soumise dans Soil and Tillage Research journal (Azzi V., Kanso A., Kazpard V., Kobeissi A., Lartiges B., El Samrani A., *Lactuca sativa* growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination).

1. Introduction

Mechanization of agriculture and addition of mineral fertilizers have been the typical responses to increase crop yields and to improve soil fertility. However, such approaches have led to significant soil compaction and soil structure deterioration. According to the literature, soil compaction is one of the main factors that influences soil physical, microbial and biochemical properties and processes (Barzegar, et al. 2006; Rosolem et al., 2002). Soil compaction increases soil bulk density, soil mechanical resistance, and surface runoff; it also reduces soil porosity and modifies the pore size distribution in the soil profile (Kulli et al., 2003; Zhang et al., 2006). The increase in soil compaction strongly influences plant productivity and crop growth rate by reducing root growth and their penetration into the soil, thus reducing water and air availability as well as ion transfer to roots and nutrients uptake (Barzegar et al., 2000; Chen et al., 2014; Głab, 2014; Kuncoro et al., 2014; Miransari et al., 2009).

If porosity reduction by compaction is a common problem encountered in ploughed soils (Kuncoro et al., 2014; Lipiec et al., 2012), soil amendment with mineral fertilizers has represented the main practice to improve the agriculture productivity. Thus, leaf surface area, leaf mass ratio and leaf area ratio of an Oleaceae species (*Fraxinus angustifolia* Vahl.) cultivated in a loamy soil were increased in a compacted soil as a result of increased amount of nutrients per volume unit (Alameda and Villar 2009, 2012; Arvidsson 1999). Unfortunately, intensive phosphate fertilization has led to the accumulation of trace metals such as zinc, cadmium, and lead in cultivated soils (Jiao et al., 2012; Lavado et al., 2001; Azzi et al. 2016). Metallic contaminants are transferred to cropland and subsequently along the food chain, which represents a critical environmental issue (Giuffré et al., 1997; Jiao et al., 2012; Nicholson et al., 2003; Luo et al., 2009). Soil compaction has been shown to inhibit nutrients transfer to plants; it thus limits the availability and the uptake of major nutrients (N, P, K, Ca, Mg and S) and micronutrients (Mn, Fe, Zn and Cu) (Barzegar et al., 2006; Lipiec and Stępniewski, 1995; Miransari et al., 2009; Zhao et al., 2007). Obviously, soil compaction also affects trace metals bioavailability (Basta et al., 2001; Qiu et al., 2011). In the case of *Trifolium alexandrinum*, soil compaction reduced both P and Zn uptake (Barzegar et al., 2006). In addition, high levels of phosphorus in soil may also slow down the uptake of trace contaminants by plants, as illustrated by *Pteris vittata* in presence of arsenic (Bolan et al., 2003a; Huang et al., 2007; Qiu et al., 2011; Yu and Zhou, 2009)

Cadmium has been identified as the most common toxic element that readily reaches the food chain because of its great bioavailability. It accumulates in large amounts in plant tissues without showing any noticeable toxic signs (Grant and Bailey, 1997; Renella et al., 2004). Previous studies of phosphate interaction with cadmium in cultivated soils evidenced antagonistic results. Pot cultivation with various crops revealed that cadmium uptake by plants was inhibited in presence of phosphate (He and Singh, 1994; Naidu et al., 1994; Yu and Zhou, 2009). Unexpectedly, soil Cd phytoextractability and Cd uptake by *Raphanus sativa L.* were found to be increased with superphosphate use in the field (Hong et al., 2008). Cadmium bioavailability depends on soil pH, organic matter content, clays and iron oxide/hydroxide contents (François et al., 2009; Grant et al., 2010; Williams and David, 1976). However, little attention has been given to the influence of soil compaction and phosphate fertilization on the cadmium behavior in soil and its influence on plant growth.

The main goal of this study is to investigate the effects of soil compaction on *Lactuca sativa* growth in presence of phosphate fertilizer and cadmium. *Lactuca sativa* is the main leafy vegetable in Mediterranean cooking and is intensively cultivated in Eastern Mediterranean countries. In the Beqaa valley, around 1500 hectares are annually cultivated with *Lactuca sativa* (Karam et al., 2002). The accumulation and translocation of Cd in plants and its distribution in compacted and non-compacted soil columns were simultaneously investigated to provide evidences of physiological and morphological modifications in the plants.

2. Experimental section

2.1 Soil sampling

A typical Mediterranean terra rosa soil was selected for this study. Soil samples were collected in the Ammik plain, a semi-arid region located in the western Beqaa valley in Lebanon (Lat. 33° 44' 17.2'' N, Long. 35° 46' 49.8'' E). No anthropogenic activity (agriculture and industry) has been reported for this sampling site. 750 kg of soil was collected over an area of 50 m² and at a depth between 0 and 50 cm. It was then air-dried at ambient room temperature, crushed and sieved through a 7 mm mesh sieve to remove coarse fragments, and finally homogenized.

The main physical and chemical properties of the soil were determined following standard methods listed in Table 1. To determine the trace metals content, soil samples were mineralized and digested using an aqua regia digestion (HNO₃: HCl_{v/v} 1:3). The concentrations of Cd, Zn, Cu, Pb, Ca, Al and Fe in the digested soil solutions were determined by Atomic Absorption

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

Spectrometry (AAS) using a Rayleigh WXF-210 AA Spectrophotometer and WF-10A Autosampler. All reagents were of analytical grade and each value reported is the average of triplicate determinations.

Table 1 Physical and chemical parameters of the sampled soil

Soil parameters	Standard methods		Amount
Soil texture (%)	Bouyoucous hydrometer method (Thien and Graveel, 2003)	Sand	26.9
		Silt	20.1
		Clay	53
Total calcareous (%)	EN ISO 10693		1.39± 0.17
Cation exchange capacity (meq.100g ⁻¹ soil)	NF-X 31-108		19.23 ± 1.16
Conductivity (μS.cm ⁻¹)	X 31-113 (NF ISO 11265)		1157 ± 23
pH	X 31-117 (NF ISO 10390)		8.21 ± 0.01
Organic matter (%)	ASTM D 2974		2.08 ± 0.02
Trace metals concentrations (mg.kg ⁻¹)	ISO 11466: 1995	Cd	1.52 ± 0.05
		Ca	818 ± 33
		Zn	98.6 ± 8.9
		Fe	33230 ± 925
		Al	37100 ± 1178
		Cu	26.1 ± 0.6
		Pb	27.05 ± 0.51

2.2 Experiment design

Two soil bulk densities, 1.2 and 1.4 g.cm⁻³, were selected to assess the effects of soil compaction on *Lactuca sativa* growth in the presence of phosphate fertilizer and cadmium contaminant. A 2x2x2 factorial randomized block experimental design was used with three replicate columns per treatment. Eight treatments were prepared by combining two soil bulk densities, two rates of P₂O₅ amendment and two Cd concentrations. The 1.2 g.cm⁻³ bulk density is representative of the density of a clay soil. The 1.4 g.cm⁻³ bulk density is selected to evaluate the effect of an increased compaction on plant growth since a 1.39 g.cm⁻³ density affects root growth according the USDA. A single superphosphate (18% P₂O₅), graciously provided by the ‘Lebanon Chemicals Company-LCC,’ was used as fertilizer. It was added to provide two phosphorus levels (0 and 109 mg P.kg⁻¹ of soil). Cadmium was added to the soil as cadmium chloride monohydrate (CdCl₂.H₂O, 99.99%; Sigma-Aldrich) to lead to 0 and 83.8 mg Cd.kg⁻¹ of soil (Table 2). The content of metals identified in the superphosphate fertilizer was negligible; Pb, Cd, Zn and Cu levels were respectively 10 ± 0.2, 5.1 ± 0.8, 92.26 ± 12 and 6 ± 0.5 mg.kg⁻¹ of fertilizer, which leads to very low added contents considering the amount of

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

fertilizer added (Kratz et al., 2016). The soils without P and Cd additions were used as control samples.

Table 2 Experimental conditions of the eight soil treatments

C	Compacted soil	C-P	Compacted soil + superphosphate*
NC	Non-compacted soil	NC-P	Non-compacted soil + superphosphate
C-Cd	Compacted soil + Cd	C-P-Cd	Compacted soil + Cd + superphosphate
NC-Cd	Non-compacted soil + Cd	NC-P-Cd	Non-compacted soil + Cd + superphosphate

*The Superphosphate used contained 18% P₂O₅

Cylindrical PVC tubes of 19.5 cm internal diameter and 45 cm height were used. The soil was deposited horizontally into the PVC columns in three layers of 10 cm thickness and then two layers of 5 cm thickness, and compacted according to the Jusoff (1991) method. An increasing load was applied five times to obtain the desired bulk density. When phosphorus and cadmium were added to the soil, they were both mixed with the upper 5 cm layer of soil before being transferred to the columns. The pot experiment was conducted in a greenhouse of controlled temperature and humidity.

2.3 Plant growth and sample preparation

The seeds of lettuce (*Lactuca sativa*) were pre-germinated for 2 weeks at 20°C in a mixture of perlite and coconut husk. One seedling was then transplanted into each column. The 24 columns were each irrigated with 750 ml of mineral water per week. Irrigation water was previously characterized (electrical conductivity of 297 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (at 25°C), pH 7.5, HCO₃³⁻ 195 mg.l⁻¹, Ca²⁺ 67 mg.l⁻¹, Mg²⁺ 1.45 mg.l⁻¹, Na⁺ 4 mg.l⁻¹, K⁺ 0.2 mg.l⁻¹ and Cl⁻ 6.5 mg.l⁻¹). The leachates of each column were collected in separate polyethylene containers the third, the fifth and the seventh week after planting.

The lettuces were grown for 77 days under controlled conditions, i.e. temperature set to 21/19 °C day/night, 12 h of light period and 60-70% air moisture. The shoots of each column were then harvested while the roots were carefully removed from the soil and washed with distilled water. Leaf number, leaf area, plant height, maximum root length and leaf length, stems and roots fresh weight were measured. The plant height, root length and leaf length were measured using a ruler. The roots and shoots were then dried at 80°C for 48 hours in a ventilated oven, and the dry mass of each part was subsequently determined.

Finally, the PVC columns were cut lengthwise and divided into 6 layers from the upper bottom, i.e. 4 layers of 5 cm thick and the last 2 layers of 10 cm thickness. Once sliced, the soil layers

were individually air-dried in a dark room for seven days followed by 2 days at 40°C. The samples were then sieved through a 2 mm mesh and digested to investigate the Cd distribution in the soil.

2.4 Total chlorophyll content

During the last days of the experiment, leaf discs were taken from each plants to determine the total chlorophyll content. Each leaf sections was first immersed in 80% acetone for 24 h in dark room at 20°C, and the total chlorophyll content Chl (a + b) was then determined by measuring the absorbance at 645 and 663 nm (spectrophotometer Thermo Spectronic 20 Genesys). The calculation was based on the method described by Arnon (1949).

2.5 Nitrate reductase activity (NRA)

A sub-sample of fresh leaves was used to determine the nitrate reductase activity according to Jaworski (1971). The analyses were performed in triplicate. A 0.5 g sample of fresh leaf tissue was sliced on small pieces and incubated with phosphate buffer (pH 7.5), and then potassium nitrate (0.03 M) and isopropanol solutions (5%) for 2 h at 28°C. The nitrite content (NRA $\mu\text{mole NO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) was determined colorimetrically at 540 nm after addition of N-1 naphthylethylenediamine dihydrochloride (0.02%) and sulphanilamide (1%).

2.6 Heavy metals in soil layers and leachate water samples

For heavy metals analysis, soil sub-samples was digested with aqua regia (3:1 HCl/HNO₃ (v/v)) according to ISO 11466:1995. The Cd, Pb and Zn concentrations of digested solutions were then analyzed by Flame Atomic Absorption Spectrometry (Rayleigh WFX-210 AA Spectrophotometer).

pH and electrical conductivity were measured in all leachates. After filtration with 0.45 μm filters, the anions concentrations (Cl⁻, NO₃⁻ and SO₄²⁻) of leachates were obtained by ion chromatography (Shimadzu Shim-pack IC-A3) equipped with a conductivity detector CDD-10AVP. Heavy metals in leachates (Cd, Pb and Zn) were also analyzed using AAS.

2.7 Accumulation, translocation and bioaccumulation of heavy metals

The dried samples were homogenized by grinding using a stainless steel blender. A sample mass between 50 and 1000 mg of each plant part, was digested in 20 mL HNO₃. The heavy metals concentrations in the various parts of the plants were then analyzed using AAS. The cadmium translocation factor from roots to shoots (F_T), was described as the ratio of Cd

concentration in the shoot to the Cd concentration in the root ($F_T = [Cd]_{shoot}/[Cd]_{root}$). Bioaccumulation factors (F_B) were obtained as the ratio between the concentrations of Cd in shoot tissue and those in the soil ($F_B = [Cd]_{shoot}/[Cd]_{soil}$) (Durand et al., 2015).

2.8 Statistical analyses

All data were analyzed using SPSS statistics 17.0. Two-way ANOVA (generalized linear models) was used at $P < 0.05$ to assess statistical significance effects of soil compaction, phosphorus, cadmium and their interactive effects. Duncan multiple range test ($\alpha = 5\%$) was performed to analyze statistical differences between different treatments for each parameter.

3. Results and Discussion

The soil used in this study is a typical Mediterranean clay soil based on USDA textural classification. It is a medium to fine textured soil of high clay content (53%) and has a CEC of about 19 meq/100g. The soil is of moderate salinity (electrical conductivity $1.157 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), shows a very low content in organic matter (OM) (2.082%) and a relatively low total calcareous concentration (about 1.4%), which is consistent with the alkaline soil pH (8.21) (Table 1). Accordingly, the amount of clay-OM complexes is expected to be low and soil compaction should easily take place affecting capillarity and water availability to roots (Kooistra et al., 1992). The levels of Zn, Cu, Pb, and Cd were under the maximum allowed limits by EU (2000). The high levels in iron and aluminum were expected for a clay terra Rosa Mediterranean soil.

3.1 Crop growth

3.1.1 Leaf growth

As shown in Table 3, the leaf number was not affected by soil compaction even when cadmium was added to the soil column, whereas a significant increase in leaf number ($P < 0.05$) was observed in lettuces treated by phosphorus fertilizer (P). Moreover, in compacted soil (C) treated with P (C-P), plants showed a significant increase in leaf area. The highest leaf area ($1635.1 \text{ cm}^2 \pm 321.2$) was found for the treatments receiving P in soils of $1.4 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ bulk density. Several studies have shown that the application of phosphate significantly increases leaf number, leaf elongation and leaf area of *Lolium perenne*, maize (*Zea mays* L.), soybean and wheat (*Triticum aestivum* L.) (Assuero et al., 2004; Chiera et al., 2002; Kavanová et al., 2006; Rodriguez et al. 1998). In addition, compaction has been shown to enhance the contact between roots and soil substrate, thus determining an increase in the volume of root cells related

to the higher amounts of nutrients per unit volume of soil and a greater water availability (Arvidsson, 1999; Barzegar et al., 2006). Such conditions have also been shown to enhance the development of leaf area for seven woody plants (Alameda and Villar, 2009).

3.1.2 Root development

Soil compaction resulted in a decrease in root length for all treatments with or without the presence of phosphate fertilizer and cadmium. Root length was reduced by 29.3% between plants growing in non-compacted and compacted soil treated with P (NC-P and C-P) (Table 3). These results are in line with those of Lipiec et al. (2012) showing a reduction by more than 50% of root length between compacted and non-compacted soil (Grzesiak et al., 2013; Rosolem et al., 2002). Soil compaction delays root development and increases the resistance to root penetration (Konopka et al., 2008). In addition, the availability of oxygen decreases and becomes a limiting factor for the normal activity of roots (Arvidsson, 1999). Nevertheless, P addition leads to an increase in root length in both compacted and non-compacted soils. Thus, root length of NC-P was 1.57 times longer than that of control NC. Phosphorus as phospholipids is a constituent of the plant cell membrane that it is concentrated in the fast growing parts of plants particularly in the root tips. Furthermore, it stimulates the development and elongation of root systems (Al-Niemi et al., 1998; Naeem et al., 2010).

Table 3 Impact of soil compaction, phosphorus fertilizer addition and cadmium contamination and their mutual interactions on morphological traits of lettuces.

	Length (cm)		Dry mass (g.column ⁻¹)	
	Leaf number	Leaf area (cm ²)	Root	Aboveground
C	19.7 ± 1.53 ^{ab}	957.0 ± 121.3 ^{bc}	7.0 ± 0.14 ^{ab}	23.2 ± 1.20 ^b
NC	19.3 ± 2.31 ^{ab}	632.4 ± 24.8 ^{ab}	7.4 ± 0.14 ^{bc}	23.2 ± 0.14 ^b
C-Cd	19.3 ± 1.15 ^{ab}	595.2 ± 175.2 ^{ab}	6.3 ± 0.35 ^a	18.4 ± 0.42 ^a
NC-Cd	17.7 ± 0.58 ^a	399.0 ± 56.7 ^a	7.5 ± 0.50 ^{bc}	16.3 ± 1.11 ^a
C-P	27.7 ± 2.08 ^c	1635.1 ± 321.2 ^d	8.2 ± 0.28 ^{cd}	29.0 ± 0.35 ^c
NC-P	26.3 ± 1.53 ^c	1021.5 ± 110.0 ^c	11.6 ± 0.78 ^f	28.4 ± 1.48 ^c
C-P-Cd	27.0 ± 1.00 ^c	1093.6 ± 313.2 ^c	8.8 ± 0.28 ^d	23.8 ± 1.20 ^b
NC-P-Cd	21.7 ± 0.58 ^b	1080.4 ± 218.4 ^c	10.2 ± 0.85 ^e	25.1 ± 1.98 ^b

	Significance	
	Root	Aboveground
C	ns	ns
P	*	*
Cd	ns	*
C x Cd	ns	ns
C x P	ns	ns
Cd x P	ns	ns
C x P x Cd	ns	ns

Note: The averages within columns followed by the same letter do not significantly differ according to Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$).

** : significance at $P<0.01$; * : significance at $P<0.05$; ns: not significant.

C : compacted soil ; NC : non compacted soil ; C-Cd : compacted soil + Cd ; NC-Cd : non compacted soil + Cd ; C-P : compacted soil + P ; NC-P : non compacted soil + P ; C-Cd-P : compacted soil + Cd + P ; NC-Cd-P : non compacted soil + Cd + P

3.1.3 Plant height

After 77 days of growth, the variation in soil bulk density was insignificant on aboveground length for all treatments. The decrease in root length development observed in compacted soils, was compensated by a higher dry weight of roots revealing a higher nutrient uptake (Table 3). In contrast, the applications of phosphate and cadmium had a significant effect on lettuce height ($P < 0.05$). Superphosphate amendment significantly enhanced shoot length by a factor of 1.2 times higher than those cultivated in both C and NC soil. Such increase may be caused by the stimulating effect of phosphorus on root development leading to a beneficial nutrient absorption.

Cadmium application had a strong negative impact on plant height. Thus, shoot height decreased by 21 and 30% for C-Cd and NC-Cd tests, respectively, in comparison with the corresponding blanks. The growth inhibition induced by a cadmium treatment is generally attributed to a perturbation of hormonal activity, especially that related to abscisic acid. The high affinity of cadmium for sulfhydryl proteins groups may also delay the lettuce growth. Such observations are consistent with previous studies reporting that plant height, leaf area and plant weight are reduced in the presence of cadmium (Chaffei et al., 2004; Dong et al., 2005; Greger and Örgen, 1991).

The presence of phosphorus mitigates the negative effect of cadmium since the plant heights in (C-P-Cd) and (NC-P-Cd) tests were equivalent to those of (C) and (NC) controls. Phosphorus application promotes Cd immobilization in the soil through the formation of cadmium-orthophosphate complexes, thus decreases the availability, of Cd to plants.

3.1.4 Dry mass of shoots and roots

While both soil compaction and P application enhanced lettuce growth and increased the dry weight of roots and shoots, Cd application led to a significant decrease in shoot dry weight (Table 3). Shoots and roots dry weight increased on average by 36% and 33% respectively, in compacted soil (C) compared with non-compacted (NC) soil. The highest shoot and root dry weight was recorded in compacted soil treated with P (C-P). Such increase in biomass of aboveground and subterranean parts can be related to the role of phosphorus in the development of a more extensive root system, which allows an increase of nutrient and water absorption (Naeem et al., 2010). The lowest dry weight was obtained for the NC-Cd treatment (Table 3). In that case, the reduction in dry weight is attributed to the effect of Cd on the

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

enzymatic activities regulating growth and physiological behavior: inhibition of water transport to the stem, decrease of essential elements uptake, reduced stomata openings and limited CO₂ absorption, are the principal factors that cause the reduction of biomass (Chaffei et al., 2004; Greger and Örgen, 1991; Grzesiak et al., 2013).

3.1.5 Chlorophyll content

The soil compaction was insignificant on the chlorophyll content in both C and N-C treatments. The most pronounced physiological response of lettuce to the various treatments was observed for the soils treated with Cd, especially that of compacted soil (C-Cd) (Table 4). Plants grown in the presence of cadmium (C-Cd and NC-Cd) or in the presence of Cd and superphosphate (C-P-Cd and NC-P-Cd), had significantly higher chlorophyll contents than those of controls and plants only treated with the phosphate fertilizer (C-P, NC-P), which implies a relationship between cadmium contamination and chlorophyll production.

Table 4 Variation of chlorophyll content and NRA in various treatments

Treatments	Chlorophyll (a+b) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	NRA ($\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
C	13.4 \pm 0.29 ^a	105.5 \pm 12 ^c
NC	13.6 \pm 0.38 ^a	121.5 \pm 2.14 ^c
C-Cd	22.4 \pm 0.2 ^d	63.9 \pm 9.86 ^a
NC-Cd	18.3 \pm 0.48 ^c	99.1 \pm 8.14 ^{bc}
C-P	12.3 \pm 0.48 ^a	162.1 \pm 15 ^d
NC-P	15.6 \pm 0.82 ^b	197.3 \pm 14.14 ^e
C-P-Cd	15.3 \pm 0.86 ^b	67.6 \pm 9 ^a
NC-P-Cd	17.4 \pm 0.75 ^c	75.8 \pm 8.57 ^{ab}
Significance		
C	ns	**
P	**	**
Cd	**	**
C x Cd	*	ns
C x P	**	ns
Cd x P	**	**
C x P x Cd	ns	*

Note: The averages within columns followed by the same letter do significantly not differ according to Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$).

** : significance at $P < 0.01$; * : significance at $P < 0.05$; ns : not significant.

C : compacted soil ; NC : non compacted soil ; C-Cd : compacted soil + Cd ; NC-Cd : non compacted soil + Cd ; C-P : compacted soil + P ; NC-P : non compacted soil + P ; C-Cd-P : compacted soil + Cd + P ; NC-Cd-P : non compacted soil + Cd + P

Such result is in agreement with that of Manios et al. (2003), who reported an increase in total chlorophyll for *Typha latifolia* plants after irrigation with solutions containing various

concentrations of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn. In that case, the increase in chlorophyll content was attributed to a change in the activity of hormones involved in chlorophyll synthesis. Furthermore, the reduction of leaf surface was correlated with the accumulation of chlorophyll pigments. Treating bean plants with Cd, Skórzyńska-Polit and Baszyński (1997) observed a disruption of thylakoid membranes in comparison with those of control. Nonetheless, soil compaction had significantly decreased the chlorophyll concentration for plants grown in the presence of superphosphate (C-P) and superphosphate with cadmium (C-P-Cd) in comparison with the same treatments for non-compacted soil (the last four treatments). Kozłowski (1999) mentioned a reduction of the rate of photosynthesis, i.e. a reduction in chlorophyll content, for two tree species (*Rubus* sp. and *Pinus contorta*) grown in compacted soils, but such observation had never been previously reported for Compositae species (*Lactuca sativa*). A significant increase in chlorophyll concentration was also observed for lettuces grown in non-compacted soil treated with superphosphate (NC-P). Such result is consistent with those of Jiang et al. (2007) and Castillo-Michel et al. (2009) who showed that phosphate increases the chlorophyll content in leaves, and hence improves the nutritional quality and the plant photosynthesis ability. Similar increases in chlorophyll contents resulting from P applications, have also been reported by Naeem et al (2010).

3.1.6 Nitrate Reductase Activity

Soil compaction led to a significant decrease in nitrate reductase activity (NRA) for all applied treatments except for the C and NC controls. A significant reduction of 17.8% was observed between NC-P and C-P (Table 4). Soil compaction is involved in nitrate leaching which promotes denitrification. In addition, it contributes to root shortening and hence to a decrease of nutrient uptake, especially nitrate. All these factors contribute to the reduction of the nitrate reductase activity in compacted soils. The observed results are in accordance with those of Goupil et al. (1998) who observed a decrease in NRA in the presence of mechanical stress. As previously shown for the compacted soils, cadmium significantly reduced the NRA of plants grown in presence of Cd (C-Cd, NC-Cd, C-P-Cd and NC-P-Cd). NRA decreased from 105.45 to 63.93 mol NO₂⁻ g⁻¹ h⁻¹ between C and C-Cd. The cadmium toxicity to plants influenced both nitrate absorption and transport from the roots to the leaves, and then led to a reduction in nitric oxide assimilation (Chaffei et al., 2004; DalCorso et al., 2008). This also affects the activity of various enzymes involved in the nitrogen metabolism within the leaf such as glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase (Chaffei et

al., 2004). In comparison with other treatments, plants treated with superphosphate (C-P and NC-P) showed a significant increase in NRA (35% and 38% greater than that of C and NC controls, respectively). Such increase is due to the positive effect of P in plant metabolism. Indeed, it has been shown that NRA is enhanced by the application of mineral nutrients, especially phosphorus (Lillo, 1994a, b; Campbell, 1999). Mineral nutrients were also found to improve nitrate assimilation in castor beans and soybean (Jeschke et al., 1997; Rufty Jr. et al., 1993).

3.2 Cd distribution along the soil columns

After 77 days, the Cd concentration in the soil columns was determined as a function of depth for all treatments. A surprising effect of soil compaction was observed below the 0-5 cm layer (C-Cd and NC-Cd tests). The Cd content in the compacted soil was only half ($17.7 \pm 0.9 \text{ mg.kg}^{-1}$) of that of the non-compacted soil ($35.6 \pm 3.4 \text{ mg.kg}^{-1}$) in the 5-10 cm layer (Fig. 1a). Therefore, soil compaction delayed the migration of Cd from the 5-10 cm layer to the 10-15 cm layer. Similarly, but to a lesser extent, in the soil treated with the phosphate fertilizer, the migration of Cd from the 0-5 cm layer to the 5-10 cm layer was less in compacted (C-P-Cd) than in non-compacted soil (NC-P-Cd) by about 7% and 21%, respectively (Fig. 1b). In all cases, the geochemical background level for Cd is reached below the 10-15 cm layer. The Cd behavior in the soil is mainly related to the soil density as well as to the phosphate content. Hence, it can be inferred that phosphate fertilizer and compaction are key factors in reducing cadmium migration since P-Cd complexes can be formed (Bolan et al., 2003a; Bolan et al., 2003b; Hong et al., 2008, Jiang et al., 2007). Nevertheless, soil compaction, with or without phosphate treatment, can be considered as the main physical barrier that increases the metal retention in the upper soil layers.

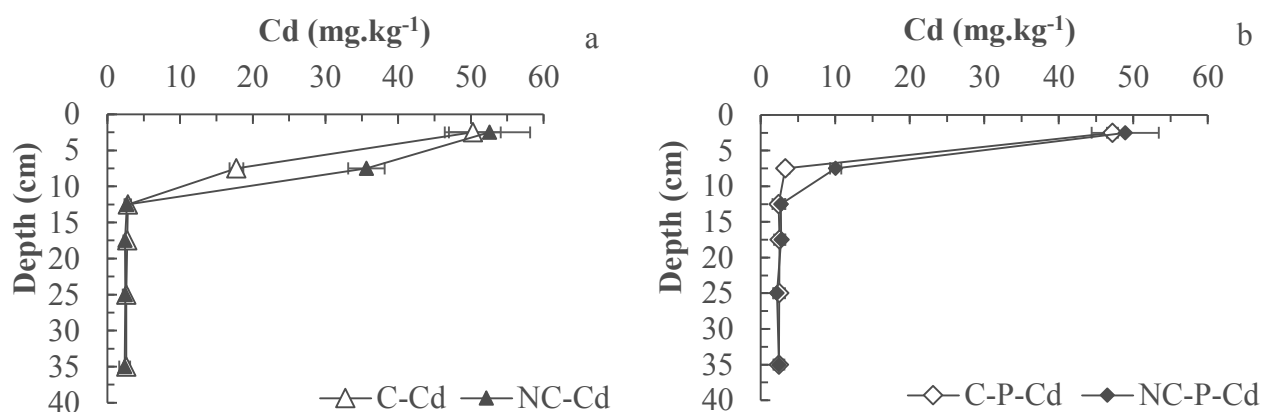


Fig. 1 Total concentrations of Cd as a function of depth in soil columns

3.3 Leachates composition

Leachates were characterized at the 3rd, the 5th and the 7th week. The pH of first leachates sampled varied between 8 and 8.2, the values of second leachates varied between 8.3 and 8.45 and those of third leachates were between 8.38 and 8.7 (Fig. 2a). However, such pH increase remains moderate and may simply be attributed to a CO₂ decrease in the soil (Summerfelt et al., 2003).

In contrast, the electrical conductivity (EC) decreased between the first and the third leachate collection (Fig. 2b). The EC of first samples varied between 1220 and 1715 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ for the various treatments, whereas those of the third leachate decreased from 963.33 to 656 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Under such conditions, the formation of metal hydroxides may occur thus decreasing the leachate conductivity (Rich et al., 2008).

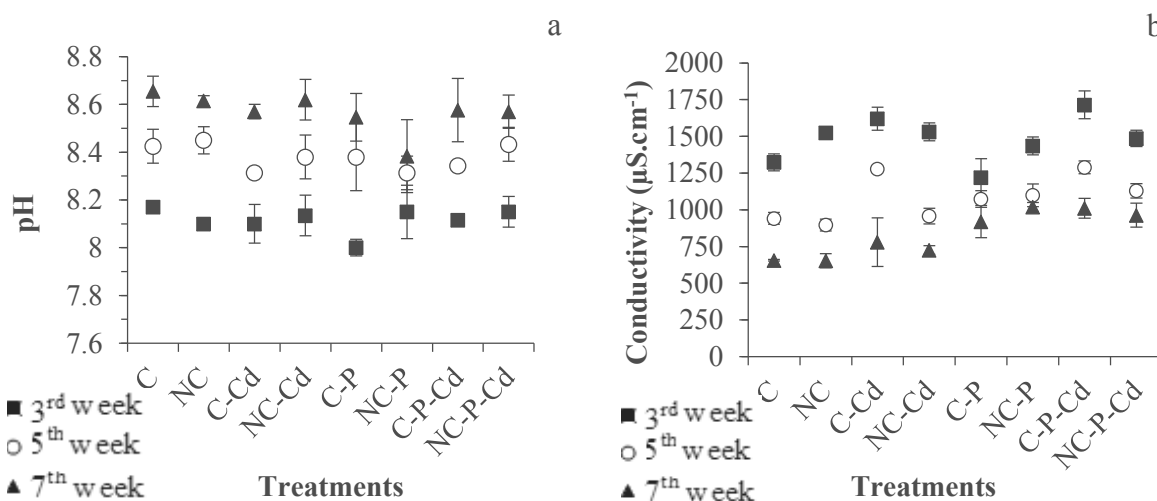


Fig. 2 Variation of pH and electrical conductivity according to soil treatment

The nitrate concentrations in the three leachates were greater for compacted soils compared with those of non-compacted soils (Fig. 3a). In particular, a decrease in nitrate concentration from 499 to 342 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ can be observed between C-Cd and NC-Cd. Previous studies by Barzegar et al. (2006) has suggested that compaction may facilitate nitrate migration. The observed decrease in nitrate concentration between consecutive leachates may be the result of combined factors, such as the denitrification in anaerobic conditions (deep soil columns), soil biomass metabolisms, nitrate leaching and nitrate assimilation by plant as a function of time (Lipiec and Stepniewski, 1995; Arvidsson, 1999).

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

In contrast, chloride and sulfate concentrations were higher in leachates from non-compacted soils (Fig. 3b, 3c). In the first leachate, soil compaction determined a 68% and 12% decrease in chloride and sulfate, respectively. Indeed, soil compaction alters soil water retention and decreases infiltration ability, thus leading to a decrease in the concentrations of those ions in the leachate (Kulli et al., 2003; Zhang et al., 2006). In both compacted and non-compacted soil, chloride leaching decreased with time and sulfate concentration was below the detection limit in the third leachates for C, NC, C-Cd and NC-Cd. When the phosphate fertilizer was added, both chloride and sulfate concentrations in the leachate of NC-P were more than twice as great than those of C-P. That sulfate concentration is higher in leachates of soil columns treated with the phosphate fertilizer is expected since the latter contains 41%wt SO₄ (Azzi et al. 2016) (Fig. 3c). Moreover, no soluble cadmium was found in those leachates because of the immobilization of available Cd by sulfate or phosphate.

Both Cd availability and Cd uptake by plants are significantly influenced by soil pH (Kirkham, 2006). Previous studies indicated that low pH values enhance Cd accumulation in plant tissues (Tsadilas et al., 2005; Waisberg et al., 2004; Yanai et al., 2006). A linear relationship between soil pH and cadmium absorption has even been reported (Christensen 1989, Tudoreanu and Phillips, 2004). Therefore, a low pH increases the concentration of cadmium ions available to root uptake.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

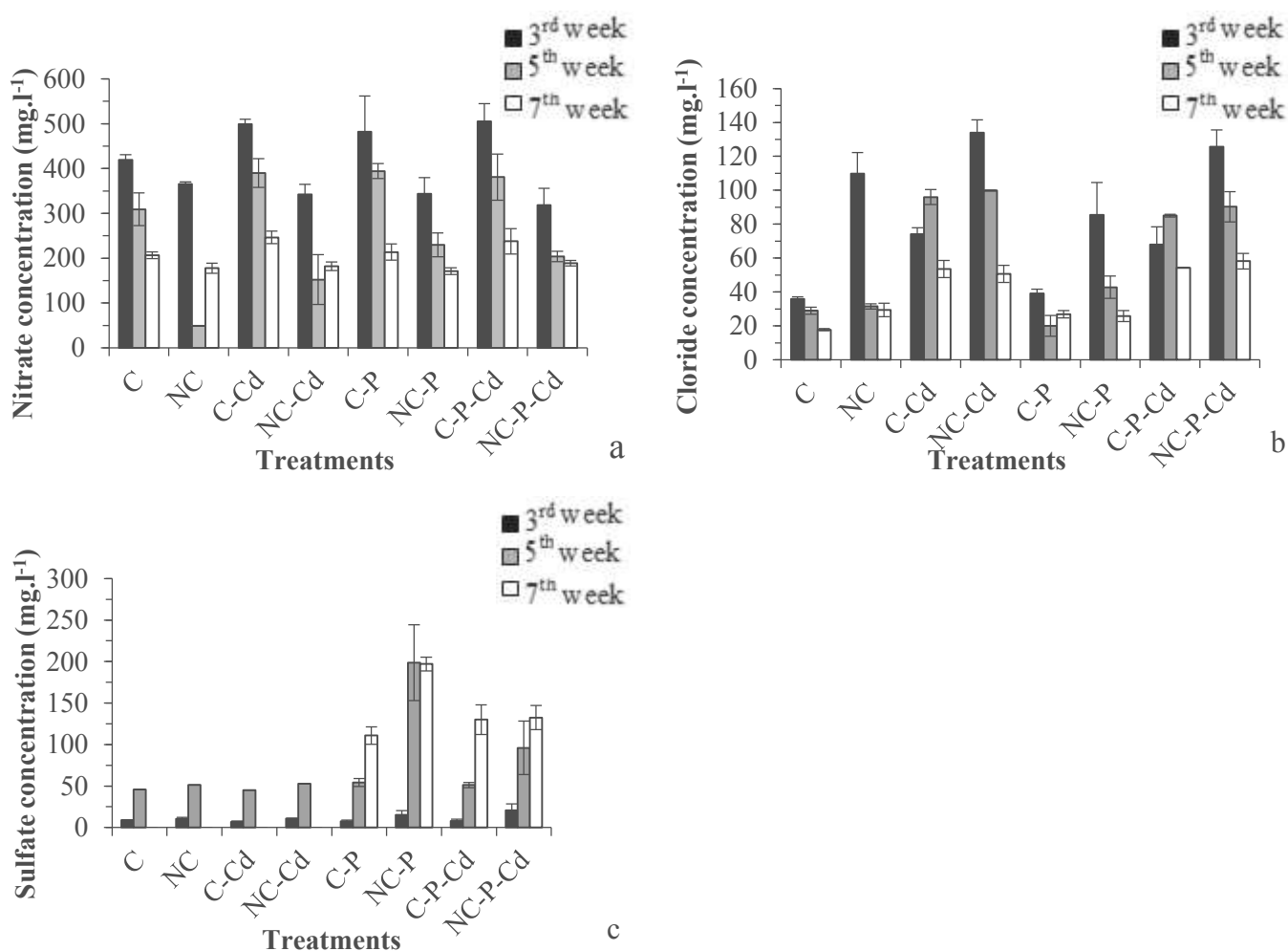


Fig. 3 Variation of nitrate, chloride and sulfate concentrations in column leachates

3.4 Cd transfer to lettuce

The Cd concentration in shoots and roots of lettuce for all soil treatments is shown in Fig. 4. The cadmium content in plant tissues grown in soil without Cd addition reflects the geochemical background level. Cd contents were similar between roots and shoots (Fig. 4). In contrast, in soils where Cd was added, root tissues and plant shoots accumulated the highest amount of Cd of all soil treatments. Furthermore, the increase in cadmium in shoots and roots was found to be associated with the increase in chlorophyll content (Table 4, Fig. 4). Similar results were found for tumbleweed, wheat, cucumber, sorghum and corn (Castillo-Michel et al., 2009; De la Rosa et al., 2004; De la Rosa et al., 2005; Youn-Joo, 2004).

Cd concentration in shoots and roots increased when Cd was added to soils with or without fertilizer amendment. Phosphate addition to the soil contaminated by Cd led to a decrease in the Cd concentration of shoots and roots (Fig. 4). Unexpectedly, the phosphate fertilizer did

not show significant effects on cadmium retention into the soil whatever the soil density. Previous studies revealed that the total Cd accumulation in *Mirabilis jalapa*, Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis* L.), cauliflowers (*Brassica oleracea* L.) and spinach (*Spinacia oleracea* L.) significantly decreased after phosphate amendment (Chen et al., 2006; Dheri et al., 2007; Qiu et al., 2011; Yu and Zhou 2009), Cd being retained in soil as $Cd_3(PO_4)_2$ deposits (Bolan et al., 2003a; Bolan et al., 2003b; Hong et al., 2008; Hong et al., 2010). The soil compaction enhanced Cd accumulation in shoots by 12% for soils treated with Cd, and by 25% for soils treated with Cd and P. Such accumulations might be attributed to the increase of root cell volume that improves nutrient uptake per root length unit (Rosolem et al., 2002). The behaviors of Zn and Pb differ to that of cadmium in roots and shoots. The levels of Zn and Pb in shoot and root tissue of lettuce are shown in Fig. 4c - 4f. Pb levels varied between 3 and 33 $mg.kg^{-1}$ and Zn levels between 21 and 115 $mg.kg^{-1}$ of dry weight tissue. On the whole, the Zn content in shoot was significantly reduced for the soils treated with phosphate and cadmium. Unexpectedly, the Zn concentration in roots increased for soils treated with Cd (C-Cd and NC-Cd) and decreased in roots grown for fertilized soils (C-P, NC-P, C-P-Cd and NC-P-Cd). The concentration of Pb in shoot for P treated soils clearly decreased without being necessary correlated to P addition. Nevertheless, in the presence of both cadmium and phosphate (C-P-Cd and NC-P-Cd), it seems that the cadmium phosphate complexation in the soil competes with the Pb-phosphate interaction, and hence the Pb uptake by shoots was improved. On the other hand, Pb concentration was higher in roots of lettuce grown in P treated soil. Such result is in agreement with that of Cao et al. (2002) who observed a decrease in Pb concentration in *St. Augustine grass* (*Stenotaphrum secundatum*) tissue after P application to Pb contaminated soils. Pb-P precipitates may form either on the root surface, within the root rhizosphere or in the bulk soil. However, soluble P decreases the concentrations of Pb, Zn and Cd in plant tissue due to the formation of mixed-metal phosphates (Hettiarachchi and Pierzynski 2002). The same authors also reported that P addition decreased Zn concentration in cabbage shoots because of the formation of mixed-metal phosphates in soil.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

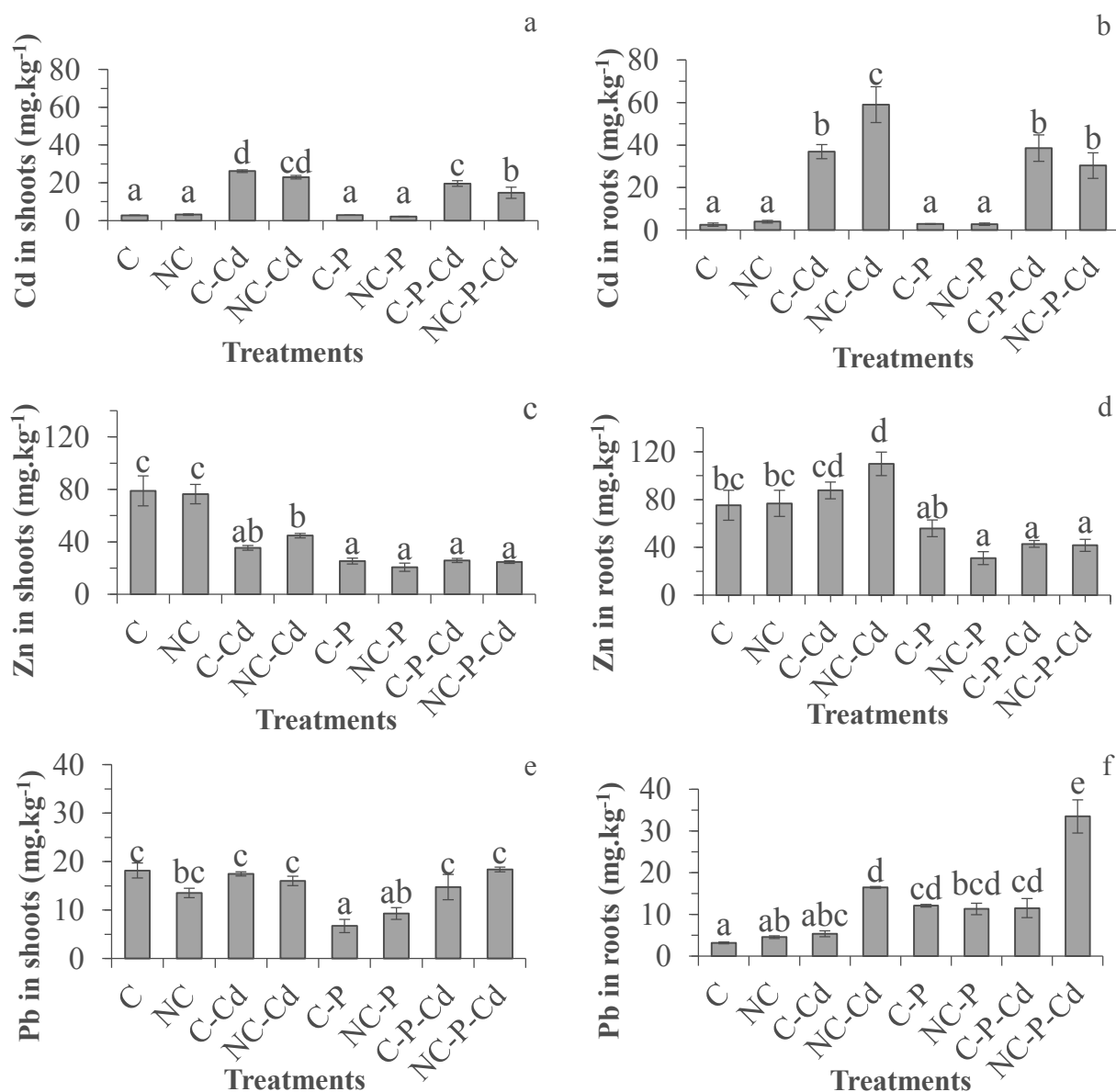


Fig. 4 Cd, Zn and Pb levels in mg.kg⁻¹ of dry shoot and mg.kg⁻¹ of dry roots of *Lactuca sativa* for the various treatments

Both Translocation factor (F_T) and bioaccumulation factor (F_B) were used to evaluate the effectiveness of lettuce in Cd translocation from roots to shoots and to evaluate its accumulation efficiency in the plants. Plants growing in compacted soils show significantly greater F_T and F_B than plants growing in non-compacted soils (Fig. 5). F_T (Cd) decreased in soils treated with Cd (C-Cd and NC-Cd) and in soils treated with both Cd and P (C-P-Cd and NC-P-Cd), whereas F_B for soils contaminated with Cd (0.81 and 0.56 for C-Cd and NC-Cd, respectively) were significantly higher when compared with soils treated with P and Cd (0.65 and 0.42 for C-P-Cd and NC-P-Cd, respectively).

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

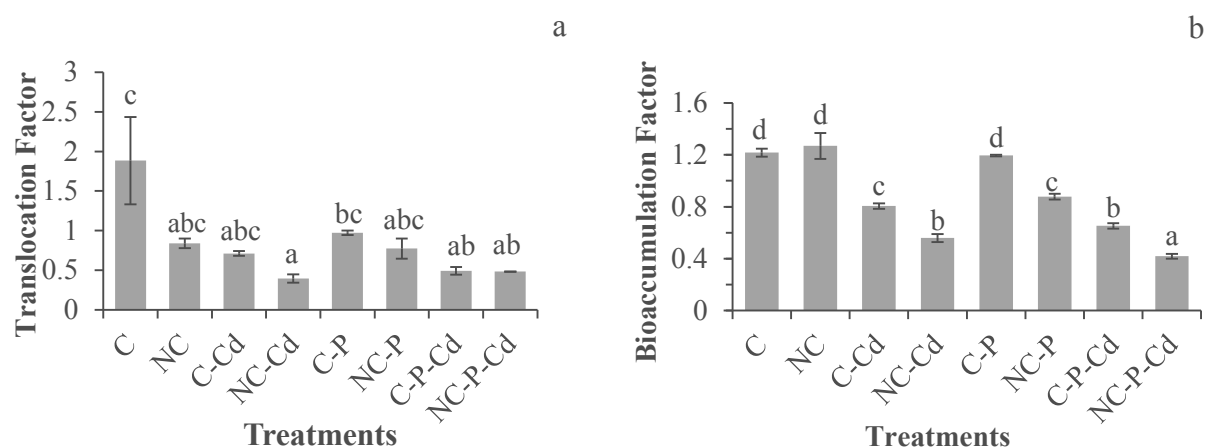


Fig. 5 Variation of Cd translocation factor and bioaccumulation factor

The relative decline in total Cd uptake and in Cd translocation factor revealed that the presence of phosphate fertilizer in soil lowers the amount of cadmium uptake by lettuce. Hence, phosphate plays a significant role in Cd translocation from root to shoot. Such process involves the immobilization of Cd²⁺ by phosphate anions especially HPO₄²⁻ onto cell walls by various mechanisms such as adsorption, complexation, precipitation, and crystallization. This leads to the formation of Cd-phosphate complexes which limit the mobility of Cd in plants (Jiang et al., 2007; Qiu et al. 2011).

4 Conclusions

Soil compaction is a key factor in agricultural production because it deeply affects plants growth, phosphate fertilizer benefits and metal transfer between soil and plants. Actually, soil compaction led to a decrease in root length, chlorophyll content and NRA in *Lactuca sativa*. Furthermore, soil compaction enhanced the cadmium transfer to roots and shoots thus inducing an increased chlorophyll production. In cadmium contaminated soils, either compacted or not, phosphate fertilization inhibited the negative effect of cadmium on all the morphological parameters of plants. The fertilization had an antagonistic role both decreasing the chlorophyll content and increasing the NRA. Soil compaction and phosphate fertilization are considered key players for limiting Cd mobility in soil. However, a decrease in both chloride and sulfate concentrations of leachates were observed for compacted soil columns, whereas a net increase in nitrate was recorded at the same time. In soils contaminated with cadmium, a phosphate fertilizer addition is recommended to inhibit Cd accumulation in *Lactuca sativa*. Soil compaction increased both Cd translocation factor (F_T) and bioaccumulation factor (F_B). On

the other hand, more attention must be paid to soil density that controls both cadmium availability and uptake by *Lactuca sativa*.

REFERENCES

- Alameda, D., Villar, R., 2009. Moderate soil compaction: Implications on growth and architecture in seedlings of 17 woody plant species. *Soil Tillage Res.*, 103, 325-331.
- Alameda, D., Villar, R., 2012. Linking root traits to plant physiology and growth in *Fraxinus angusifolia* Vahl. seedlings under soil compaction conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 79, 49-57.
- Al-Niemi, T.S., Kahn, M.L., McDermott, T.R., 1998. Phosphorus uptake by bean nodules. *Plant Soil*, 198, 71-78.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, 1-15.
- Arvidsson, J., 1999. Nutrient uptake and growth of barley as affected by soil compaction. *Plant Soil*, 208, 9-19.
- Assuero, S.G., Mollier, A., Pellerin, S., 2004. The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. *Plant, Cell Environ.*, 27, 887-895.
- ASTM D 2974 (2007). Standard test method for moisture, ash, and organic matter of peat and other organic soils, American Society for Testing and Materials. Philadelphia, PA, USA, 4p.
- Azzi, V., Kazpard, V., Lartiges, B., Kobeissi, A., Kanso, A., El Samrani, A.G., 2016. Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries. Submitted to *Clean-Soil, Air, Water*.
- Barzegar, A.R., Asoodar, M.A., Ansari, M., 2000. Effectiveness of sugarcane residue incorporation at different water contents and the Proctor compaction loads in reducing soil compatibility. *Soil Tillage Res.*, 57, 167-172.
- Barzegar, A.R., Nadian, H., Heidari, F., Herbert, S.J., Hashemi, A.M., 2006. Interaction of soil compaction, phosphorus and zinc on clover growth and accumulation of phosphorus. *Soil Tillage Res.*, 87, 155-162.
- Basta, N.T., Gradwohl, R., Snethen, K.L., Schroder, J.L., 2001. Chemical immobilisation of lead, zinc and cadmium in smelter contaminated soils using biosolids and rock phosphate. *J. Environ. Qual.* 30, 1222-1230.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

- Bolan, N.S., Adriano, D.C., Duraisamy, P., Mani, A., Arulmozhiselvan, K. 2003a. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. I. Effect of phosphate addition. *Plant Soil*, 250, 83-94.
- Bolan, N.S., Adriano, D.C., Naidu, R., 2003b. Role of phosphorus in (im)mobilization and bioavailability of heavy metals in the soil–plant system. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 177, 1-44.
- Campbell, W.H., 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 277-303.
- Cao, X.D., Ma, Q.Y., Chen, M., Singh, S.P., Harris, W.G., 2002. Impacts of phosphate amendments on lead biogeochemistry at a contaminate site. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 5296-5304.
- Castillo-Michel, H., Hernandez, N., Martinez-Martinez, A., Parsons, J., Peralta-Videa, J., Gardea-Torresdey, J., 2009. Coordination and speciation of cadmium in corn seedlings and its effects on macro- and micronutrients uptake. *Plant Physiol. Biochem.*, 47, 608-614.
- Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M.H., Masclaux-Daubresse, C. 2004. Cd toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol.*, 45 (11), 1681-1693.
- Chen, S.B., Zhu, Y.G., Ma, Y.B., 2006. The effect of grain size of rock phosphate amendment on metal immobilization in contaminated soils. *J. Hazard. Mater.*, B, 134, 74-79.
- Chen, Y., Palta, J., Clements, J., Buirchell, B., Siddique, K., Rengel, Z., 2014. Root architecture alteration of narrow-leaved lupin and wheat in response to soil compaction. *Field Crop Res.*, 165, 61-70.
- Chiera, J., Thomas, J., Rufty, T., 2002. Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. *J. Exp. Bot.*, 53 (368), 473-481.
- Christensen, T.H., 1989 Cadmium soil sorption at low concentrations: VIII. Correlation with soil parameters. *Water Air Soil Pollut.*, 44, 71-82.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A., 2008. How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *J. Integr. Plant Biol.*, 50 (10), 1268-1280.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

- De la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Parsons, J.G., Cano-Aguilera, I., Gardea-Torresdey, J.L., 2004. Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere*, 55, 1159-1168.
- De la Rosa, G., Martinez-Martinez, A., Pelayo, H., Peralta-Videa, J.R., Sanchez-Salcido, B., Gardea-Torresdey, J.L. 2005. Production of low-molecular weight thiols as a response to cadmium uptake by tumbleweed (*Salsola kali*). *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 491-498.
- Dheri, G.S., Brar, M.S., Malhi S.S., 2007. Influence of phosphorus application on growth and cadmium uptake of spinach in two cadmium-contaminated soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170, 495-499.
- Dong, J., Wu, F., Zhang, G., 2005. Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 6 (10), 974-980.
- Durand, A., Piutti, S., Rue, M., Morel, J.L., Echevarria, G., Benizri, E. 2015. Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Soil*, <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-015-2691-2>
- EN ISO 10693 (2014). Soil quality-Determination of carbonate content-Volumetric method.
- European Union, 2000. Working Document on sludge, 3rd Draft. Brussels, 27 April 2000. ENV.E.3/LM, pp. 19.
- François, M., Grant, C., Lambert, R., Sauvé, S., 2009. Prediction of cadmium and zinc concentration in wheat grain from soils affected by the application of phosphate fertilizers varying in Cd concentration. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 83, 125-133.
- Giuffré L., Ratto S., Marbán L., 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Sci. Total Environ.*, 204, 245-250.
- Głąb, T., 2014. Effect of soil compaction and N fertilization on soil pore characteristics and physical quality of sandy loam soil under red clover/grass sward. *Soil Tillage Res.*, 144, 8-19.
- Goupil, P., Loncle, D., Druart, N., Bellettre, A., Rambour, S. 1998. Influence of ABA on nitrate reductase activity and carbohydrate metabolism in chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *J. Exp. Bot.*, 49 (328), 1855-1862.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

- Grant C.A., Bailey L.D., 1997. Effects of Phosphorus and Zinc Fertiliser Management on Cadmium Accumulation in Flaxseed. *J. Sci. Food Agric.*, 73, 307-314.
- Grant, C.A., Monreal, M.A., Irvine, R.B., Mohr, R.M., McLaren, D.L., Khakbazan, M., 2010. Preceding crop and phosphorus fertilization affect cadmium and zinc concentration of flaxseed under conventional and reduced tillage. *Plant Soil*, 333, 337-350.
- Greger, M., Örgen, E., 1991. Direct and indirect effects of Cd²⁺ on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.*, 83, 129-135.
- Grzesiak, S., Grzesiak, M.T., Hura, T., Marcińska, I., Rzepka, A., 2013. Changes in root system structure, leaf water potential and gas exchange of maize and triticale seedlings affected by soil compaction. *Environ. Exp. Bot.*, 88, 2-10.
- He, Q.B., Singh, B.R., 1994. Crop uptake of cadmium from phosphorus fertilizers: I. Yield and cadmium content. *Water Air Soil Pollut.*, 74, 251-265.
- Hettiarachchi, G.M., Pierzynski, G.M., 2002. In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: Influence of plant growth. *J. Environ. Qual.*, 31, 564-572.
- Hong, C.O., Lee, D.K., Kim, P.J., 2008. Feasibility of phosphate fertilizer to immobilize cadmium in a field. *Chemosphere*, 70, 2009-2015.
- Hong, C.O., Chung, D.Y., Lee, D.K., Kim, P.J., 2010. Comparison of phosphate materials for immobilizing cadmium in soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 268-274.
- Huang, Z., A.N, Z., Chen, T., Lei, M., Xiao, X., Liao, X., 2007. Arsenic uptake and transport of *Pteris vittata* L. as influenced by phosphate and inorganic arsenic species under sand culture. *J. Environ. Sci.*, 19, 714-718.
- ISO 11466 (1995). Soil quality-Extraction of trace elements soluble in *aqua regia*.
- Jaworski, E.G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissue. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 43 (6), 1274-1279.
- Jeschke, W.D., Kirkby, E.A., Peuke, A.D., Pate, J.S., Hartung, W., 1997. Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). *J. Exp. Bot.*, 40 (306), 75-91.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

- Jiang, H.M., Yang, J.C., Zhang, J.F., 2007. Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress. *Environ. Pollut.*, 147, 750-756.
- Jiao, W., Chen, W., Chang, A., Page, A., 2012. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: A review. *Environ. Pollut.*, 168, 44-53.
- Jusoff, K. 1991. Effect of compaction of soils on growth of *Acacia mangium* Willd. under glasshouse conditions. *New Forests*, 5 (1), 61-66.
- Karam, F., Mounzer, O., Sarkis, F., Lahoud, R., 2002. Yield and nitrogen recovery of lettuce under different irrigation regimes. *J. Appl. Hort.*, 4, 70-76.
- Kavanová, M., Lattanzi, F.A., Grimoldi, A.A., Schnyder, H., 2006. Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves. *Plant Physiol.*, 141, 766-775.
- Kirkham, M.B., 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137, 19-32.
- Konôpka, B., Pagès, L., Doussan, C., 2008. Impact of soil compaction heterogeneity and moisture on maize (*Zea mays* L.) root and shoot development. *Plant Soil Environ.*, 12, 509-519.
- Kooistra, M.J., Schoonderbeek, D., Boone, F.R., Veen, B.W., Vannoordwijk, M., 1992. Root-soil contact of maize, as measured by a thin-section technique. Effects of soil compaction. *Plant Soil*, 139, 119-129.
- Kozłowski, T.T., 1999. Soil compaction and growth of woody plants. *Scand. J. For. Res.*, 14, 596-619.
- Kratz, S., Schick, J., Schnug, E., 2016. Trace elements in rock phosphates and P containing mineral and organo-mineral fertilizers sold in Germany. *Sci. Total Environ.*, 542, 1013-1019.
- Kulli., B., Gysi, M., Flühler, H., 2003. Visualizing soil compaction based on flow pattern analysis. *Soil Tillage Res.*, 70 (1), 29-40.
- Kuncoro, P.H., Koga, K., Satta, N., Muto, Y., 2014. A study on the effect of compaction on transport properties of soil gas and water I: Relative gas diffusivity, air permeability, and saturated hydraulic conductivity. *Soil Tillage Res.*, 143, 172-179.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

- Lavado, R.S., Porcelli, C.A., Alvarez, R., 2001. Nutrient and heavy metal concentration and distribution in corn, soybean and wheat as affected by different tillage systems in the Argentine Pampas. *Soil Tillage Res.*, 62, 55-60.
- Lillo, C., 1994a. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.*, 90, 616-620.
- Lillo, C., 1994b. Light/dark regulation of higher plant nitrate reductase related to hysteresis and calcium/magnesium inhibition. *Physiol. Plant.*, 91, 295-299.
- Lipiec, J., Stępniewski, W., 1995. Effects of soil compaction and tillage systems on uptake and losses of nutrients. *Soil Tillage Res.*, 35, 37-52.
- Lipiec, J., Hom, R., Piertrusiewicz, J., Siczek, A., 2012. Effects of soil compaction on root elongation and anatomy of different cereal plant species. *Soil Tillage Res.*, 121, 74-81.
- Luo, L., Ma, Y., Zhang, S., Wei, D., Zhu, Y., 2009. An inventory of trace element inputs to agricultural soils in China. *J. Environ. Manage.*, 90, 2524-2530.
- Manios, T., Stentiford, E.I., Millner, P.A. 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecol. Eng.*, 20, 65-74.
- Miransari, M., Bahrami, H.A., Rejali, F., Malakouti, M.J., 2009. Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. *Soil Tillage Res.*, 103, 282-290.
- Naeem, M., Khan, M.M.A., Moinuddin, Idrees, M., Aftab, T., 2010. Phosphorus ameliorates crop productivity, photosynthetic efficiency, nitrogen-fixation, activities of the enzymes and content of nutraceuticals of *Lablab purpureus* L. *Sci. Hortic.*, 126, 205-214.
- Naidu, R., Bolan, N.S., Kookana, R.S., Tiller, K.G., 1994. Ionic strength and pH effects on the adsorption of cadmium and the surface charge of soils. *Eur. J. Soil Sci.*, 45, 419-429.
- NF ISO 10390, 2005. Qualité du sol - Détermination du pH.
- NF ISO 11265, 1995. Soil quality-Determination of the specific electrical conductivity.
- NF X 31-108 (2002). Qualité des sols- Détermination des cations Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ extractibles par l'acétate d'ammonium-Méthode par agitation.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

- Nicholson, F.A., Smith Sr., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales, *Sci.Total Envir.*, 311, 1-3, 205-219.
- Qiu, Q., Wang, Y., Yang, Z., Yuan, J., 2011. Effects of phosphorus supplied in soil on subcellular distribution and chemical forms of cadmium in two Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis* L.) cultivars differing in cadmium accumulation. *Food Chem. Toxicol.*, 49, 2260-2267.
- Renella, G., Mench, M., Lelie, D. Van Der, Pietramellara, G., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Nannipieri, P., 2004. Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 36, 443-451.
- Rich, C., Gronow, J., Voulvoulis, N., 2008. The potential for aeration of MSW landfills to accelerate completion. *Waste Manage.*, 28, 1039-1048.
- Rodriguez, D., Keltjens, W.G., Goudriaan, J., 1998. Plant leaf area expansion and assimilate production in wheat (*Triticum aestivum* L.) growing under low phosphorus conditions. *Plant Soil*, 200, 227-240.
- Rosolem, C.A., Foloni, J.S.S., Tiritan, C.S., 2002. Root growth and nutrient accumulation in cover crops as affected by soil compaction. *Soil Tillage Res.*, 65, 109-115.
- Rufty JR, T.W., Israel, Q.W., Volk, R.J., Qiu, J., Sa, T., 1993. Phosphate regulation of nitrate assimilation in soybean. *J. Exp. Bot.*, 44 (5), 879-891.
- Skórzyńska-Polit, E. and Baszyński, T., 1997. Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. *Plant Sci.*, 128, 11-21.
- Summerfelt, S.T., Davidson, J., Waldrop, T., 2003. Evaluation of full-scale carbon dioxide stripping columns in a coldwater recirculating system. *Aquac. Eng.*, 28, 155-169.
- Thien, S.J., Graveel, J.G. (2003). *Laboratory Manual for Soil Science, Agricultural and Environmental Principles*, Preliminary ed., Iowa: Kendall/Hunt publishing company, p. 207.
- Tsadilas, C.D., Karaivazoglou, N.A., Tsotsolis, N.C., Stamatiadis, S., Samaras, V., 2005. Cadmium uptake by tobacco as affected by liming, N form, and year of cultivation. *Environ. Pollut.*, 134, 239-246.

Lactuca sativa growth in compacted and non-compacted semi-arid alkaline soil under phosphate fertilizer treatment and cadmium contamination

Tudoreanu, L., Phillips, C.J.V., 2004. Empirical models of cadmium accumulation in maize, rye grass and soya bean plants. *J. Sci. Food Agr.*, 84, 845-852.

USDA Soil Quality Kit-Guides for Educators. Soil Bulk Density/ Moisture/ Aeration. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Services.

Waisberg, M., Black, W.D., Waisberg, C.M., Hale, B., 2004. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food Chem. Toxicol.*, 42, 835-842.

Williams, C.H., David, D.J., 1976. The accumulation in soil of cadmium residues from phosphate fertilizers and their effect on the cadmium content of plants. *J. Soil Sci.*, 121, 86-93.

Yanai, J., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Kosaki, T., 2006. Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Pollut.*, 139, 167-175.

Youn-Joo, A., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.*, 127, 21-26.

Yu, Z., Zhou, Q., 2009. Growth responses and cadmium accumulation of *Mirabilis jalapa* L. under interaction between cadmium and phosphorus. *J. Hazard. Mater.*, 167, 38-43.

Zhang, S., Grip., H., Lövdahl, L., 2006. Effect of soil compaction on hydraulic properties of two loess soils in China. *Soil Tillage Res.*, 90, 117-125.

Zhao, F.-J., Lopez-Bellido, F.J., Gray, C.W., Whalley W.R., Clarck, L.J., McGrath, S.P., 2007. Effects of soil compaction and irrigation on the concentrations of selenium and arsenic in wheat grains. , *Sci.Total Envir.*, 372, 433-439.

Récapitulatif

Dans la partie (B), les effets de la compaction, du cadmium et des engrais phosphatés ont été évalués sur les caractères morphologiques et physiologiques des laitues ainsi que la migration du Cd et son transfert aux plantes.

La compaction a engendré une diminution de la longueur des racines, du contenu de la chlorophylle et de l'activité de la nitrate réductase (ANR), une augmentation de la masse sèche des racines et des feuilles, de la surface foliaire, du facteur de transfert du Cd des racines à la partie aérienne. Les résultats obtenus montrent les effets du Cd sur la biomasse de *Lactuca sativa* ainsi que les concentrations de Cd, Zn et Pb dans les différentes parties de la plante. Ainsi, pour pouvoir conclure les quantités accumulées dans les plantes, il a fallu calculer les minéralomasses (**Figure 33**) selon la formule:

Minéralomasse = biomasse des organes * concentration en ETM dans les organes

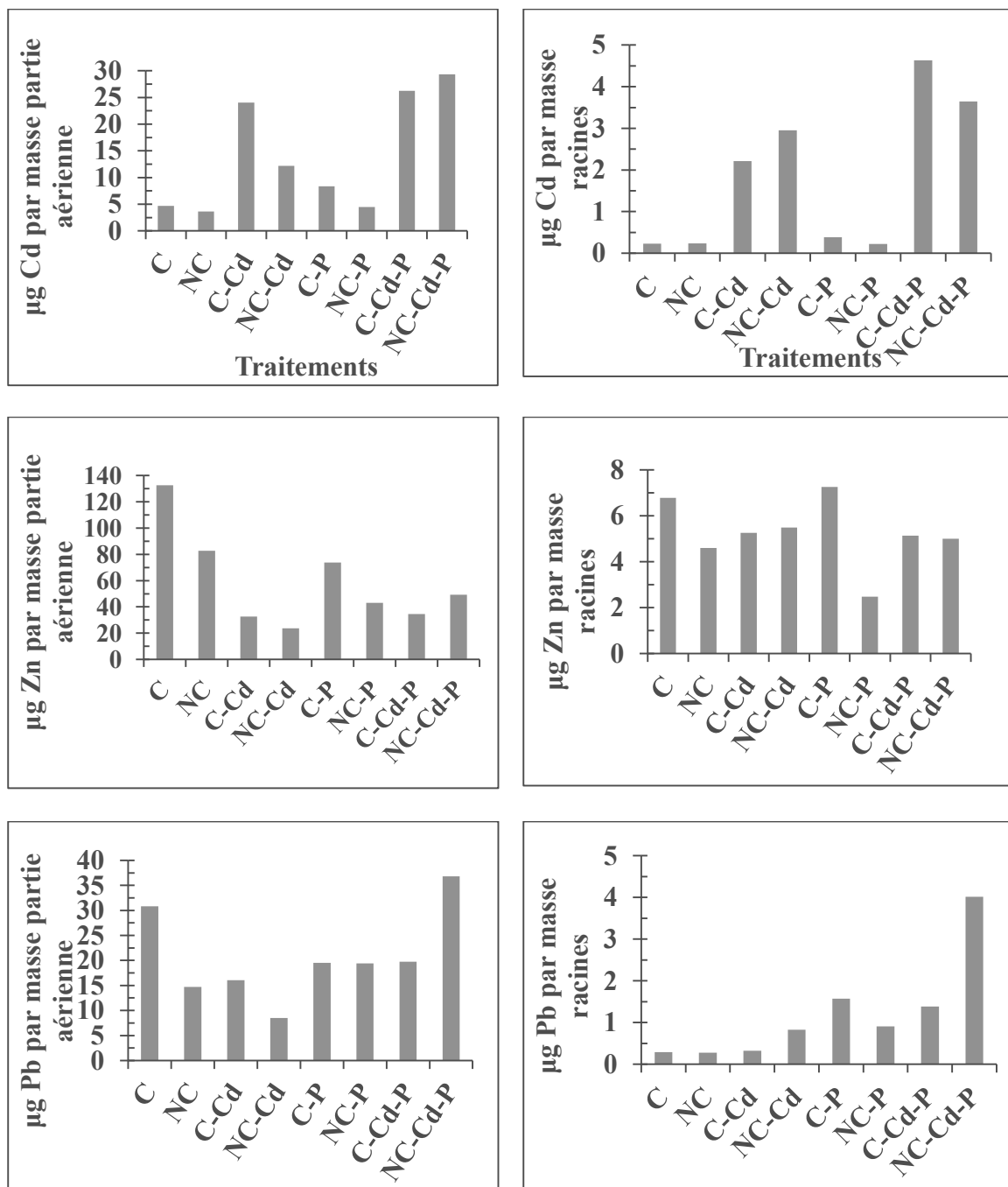


Figure 33 Quantités en µg de Cd, Zn et Pb par masse totale de partie aérienne et de racines exprimée en g dans les différents traitements.

En comparant les concentrations de Cd trouvé dans les parties aériennes et les racines aux quantités de Cd relative à la masse de ces organes, on observe la même allure ce qui n'est pas le cas du Zn dans la partie aérienne et racinaire dans les traitements C-P où on a une augmentation de la quantité du Zn due à une masse plus élevée de ces organes. Bien que dans

les feuilles on a une quantité de 26 et 29 $\mu\text{g Cd/g}$ dans les traitements C-Cd-P et NC-Cd-P respectivement, qui sont des valeurs supérieures à celles trouvées dans les plantes accumulatrices (20 $\mu\text{g Cd/g}$) (Reeves and Baker, 2000), les plantes ont résisté à ce stress. Le Pb avait une allure presque semblable mais la différence est observée au niveau des traitements NC-Cd et C-Cd-P. Bien que le sol utilisé avait une concentration faible en Pb, on a identifié une quantité de ce métal dans *Lactuca sativa* égale à 30 $\mu\text{g Pb}$ par masse totale des feuilles (exprimée g). En présence d'engrais phosphaté, la longueur des laitues et des racines, le nombre de feuilles, la masse sèche, la surface foliaire et l'activité de l'ANR ont augmenté. L'ensemble de ces paramètres ont diminué en présence du cadmium. En revanche, le cadmium a stimulé la production de chlorophylle. La compaction et la fertilisation sont considérés comme des facteurs limitant la mobilité du Cd dans le sol. La compaction a de même une influence sur l'infiltration des anions; le chlorure et le sulfate et du Zn sont trouvés dans l'eau infiltrée des sols non compactés et augmente avec le temps tandis que les nitrates et le Pb sont trouvés dans l'eau infiltré des sols compactés (Figure 34).

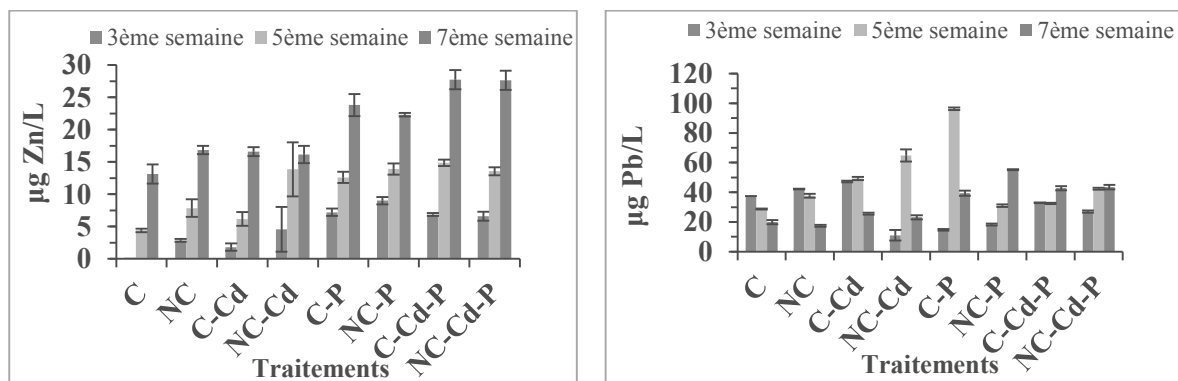


Figure 34 Concentrations de Zn et Pb dans l'eau infiltrée dans les différents traitements

Puisque la combinaison des différents traitements a influencé les propriétés des laitues et la migration du cadmium, il est donc judicieux d'investiguer les influences de ces facteurs sur le développement de la population microbienne (bactéries totales, champignons, bactéries résistantes au cadmium et micro-organismes solubilisant le phosphore) et les activités enzymatiques des phosphatases acides et alcalines et des déshydrogénases dans les différentes strates de sol et la rhizosphère de *Lactuca sativa*. Ainsi la partie suivante (C) vient développer ces influences.

Partie C

**MICROBIAL BIOMASS GROWTH UNDER CADMIUM
INPUT INTO ALKALINE SOIL AMENDED WITH
PHOSPHATE FERTILIZER**

Résumé

L'utilisation de la machinerie lourde et la fertilisation dans les pratiques agricoles a conduit à la compaction des sols et sa contamination par les éléments traces métalliques. Afin d'étudier les effets de la compaction du sol, du cadmium, de la fertilisation phosphatée et leurs interactions avec la profondeur, l'isolement et le dénombrement des bactéries totaux, champignons totaux, micro-organismes solubilisant le phosphate (PSM) et des bactéries résistantes au cadmium (CRB) ainsi que la performance des phosphatases alcalines (ALP) et les acides et l'activité de la déshydrogénase (DHA) ont été suivis dans un sol argileux sous un climat aride planté de *Lactuca sativa* utilisée comme plante modèle. Les laitues ont été cultivées dans des séries de colonne de sol ayant subi deux compactations et amendées par des engrais phosphatés avec ou en absence du cadmium. En général, le nombre de micro-organismes et l'activité des enzymes ont été minimales quand la compaction était importante et en présence de cadmium à l'exception des CRB et des phosphatases acides. Au contraire, l'engrais phosphaté a un rôle positif dans la prolifération microbienne et la stimulation des activités enzymatiques et un rôle inhibiteur du développement des champignons et de l'activité de l'ALP. Dans le traitement où le cadmium et l'engrais phosphaté étaient présents ensemble dans le sol, le nombre total des bactéries et des champignons a diminué mais celui de PSM et CRB et l'activité de DHA ont augmenté. Dans le même traitement, les activités des phosphatases ont diminué à l'opposé de celle de la DHA. Dans un sol alcalin, contaminé en cadmium, les bactéries résistantes au cadmium peuvent être utilisées pour diminuer les effets nocifs de ce métal en le rendant moins toxique pour les plantes et les micro-organismes solubilisant le phosphate inoculés dans le sol peuvent agir comme biofertilisant en rendant le P inorganique disponible aux plantes induisant une augmentation de la DHA et des phosphatases responsable de l'approvisionnement des plantes en éléments nutritifs.

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

Abstract¹

The use of heavy machinery and fertilization had led to the compaction of soil and its contamination with heavy metals. In order to study the effects of soil density, cadmium and phosphate fertilizer inputs and their interactions along the soil depth, isolation and enumeration of total bacteria, total fungi, phosphate solubilizing microorganism (PSM) and cadmium resistant bacteria (CRB), in addition to the performance of three soil enzymes (alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase and dehydrogenase (DHA)) were followed in clay and arid soil planted by *Lactuca sativa* as a model plant. Two bulk densities representing compacted and non-compacted soils were amended by phosphate fertilizer with or without cadmium addition. In general, compaction and cadmium showed negative effects on the microorganisms' counts and enzymes activities but with some exception (CRB and acid phosphatase). On the other hand, superphosphate played a positive role in stimulating the flourishing of microorganisms but not for fungi and alkaline phosphatase production. Under combined phosphate - cadmium treatment, the number of total bacteria and fungi was reduced while the counts of the PSM and CRB were significantly increased. The activities of alkaline and acid phosphatase were decreased in the combined treatment in opposite to DHA. CRB can be used in cadmium contaminated alkaline soil to decrease the hazardous effects of this metal in making it less toxic to plants and PSM inoculated to soil can act as a biofertilizer in solubilizing inorganic P and making it available to plant leading to an increase of DHA and phosphatase enzymes responsible of nutrient supply to plant.

1. Introduction

Soil represents a favorable media for microorganisms including bacteria, fungi, enzyme secretions and many other fauna (Nannipieri et al., 2012; Vig et al., 2003). Diversity and activity of microorganisms are important indices of soil quality. They are sensitive indicators of stress applied on soil, and their functions are related to soil health and fertility (Hinojosa et al., 2005; Vig et al., 2003; Wang et al., 2007). Microbial populations are key components of the soil-plant continuum and their interactions affect the plant development (Hu et al., 2009; Oliveira et al., 2009). Bacteria and fungi are found in large amount in soil (Vig et al., 2003). They play a role in many reactions; *Rhizobia* provide nitrogen to plants and phosphate solubilizing bacteria like *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium* etc. solubilize insoluble inorganic phosphate compounds (Rodríguez and Fraga, 1999). Between fungi, bacteria and actinomyces, bacteria are the predominant microorganisms that are able to solubilize phosphate components (Hu et al., 2009; Kucey, 1983). Fungi can live in symbiosis with plant roots, facilitating the uptake of immobile nutrients such as phosphorus and potassium or decomposing the complex compounds such as cellulose lignin and chitin (Vig et al., 2003).

Soil enzyme activities depend on environmental factors and have an optimal pH. It is well known that alkaline phosphatase activity prevail over acid phosphatase activity in neutral or alkaline soil, and the opposite behavior occurs in acidic soil (Dick et al., 2000, Krämer and Green, 2000; Tan et al., 2008). Phenol oxidase and peroxidase activities were found positively correlated to soil pH (Nannipieri et al., 2012; Sardans et al., 2008). Dehydrogenase is involved in the microbial respiratory processes because it has a role in the oxidation of organic matters, while phosphatase plays a role in the production of inorganic phosphate synthesized from organic phosphate esters and releasing of phosphate for plants (Sardar et al., 2007; Tan et al., 2008). Enzyme activities decrease due to high temperature in summer and high moisture in winter (Nannipieri et al., 2012).

Currently, agriculture machinery, fertilizers, pesticides and biotechnology are considered as the main tools for any advanced agriculture (Pupin et al., 2009). Developing new hard equipment's is beneficial in boosting yield crops but it has also negative side effects. Repetitive and intensive use of agriculture machinery had conducted to soil compaction and degradation of its structure. Thus, changes in soil physical properties reduced plant productivity and crop growth and limited nutrients availability and inhibited microbial and biochemical processes (Li

et al., 2002; Pengthamkeerati et al., 2011; Pupin et al., 2009). Soil compaction increases the soil bulk density, its mechanical resistance, runoff surfaces, reduces soil porosity and modifies pore size distribution in soil profile (Shestak and Busse, 2005; Nawaz et al., 2013). Thus, in compacted soil, plant roots will have difficulties penetrating the soil and microbial activity such as respiration and enzyme activities are decreased due to restriction of oxygen diffusion (Buck et al., 2000; Canbolat et al., 2006; Jordan et al., 2003). Macropore functions like water infiltration, hydraulic conductivity and aeration are also reduced (Jordan et al., 2003; Li et al., 2002; Pengthamkeerati et al., 2011).

On the other hand, phosphate fertilization use was generalized in agriculture to meet the needs of intensive agriculture practices. It is an essential nutriment for plants that assures biological tissue growth and root development. Naturally, its geochemical background depends on soil origins and the nature of surrounding outcrops, it ranges between 400 and 1200 mg/Kg (Rodríguez and Fraga, 1999). Phosphate fertilizers are well known as heavy metals sources in agricultural soils (Jiao et al., 2012; Lambert et al., 2007). Excess usage, repetitive application and non-specialized utilization of this fertilizer increases potentially the levels of heavy metals in soil where they persisted or at least transferred to plants and accumulated along the food chains (Aghababaei et al., 2014; Giuffré et al., 1997). Heavy metals are known as inhibitors of enzyme activities and have toxic effects on soil microbiota (Vig et al., 2003; Wang et al., 2007; Zhi-xin et al., 2006). Many studies showed that repeated applications of fertilizers can minimize the production of soil enzymes (Giuffré et al., 1997).

Cadmium is one of the most studied heavy metal in agricultural soil after phosphate fertilization (François et al., 2009; Grant et al., 2010). This element has a great toxic potential without any metabolic functions (Lorenz et al., 2006; Renella et al., 2004; Zorrig et al., 2010). It is found in large amounts in chemical fertilizers, up to 150 mg/Kg in some fertilizers (Lambert et al., 2007). Naturally, it occurs at low geochemical background levels (0.5 ppm) (Giuffré et al., 1997) while fertilization activities have led to its concentration in soil and its migration along the plant tissues (Castillo-michel et al., 2009; Renella et al., 2004; Schipper et al., 2011; Vig et al., 2003). Interactions between cadmium and zinc in soil are observed because of their geochemical similarity (Köleli et al., 2004; Lambert et al., 2007). The association of the two elements leads to cadmium translocation from roots to upper plant parts by crossing biological barriers and accumulating in plant tissues (Jiang et al., 2007; Lambert et al., 2007).

An increase of cadmium in soil after phosphate fertilization is accompanied with an increase of cadmium in plants (Grant et al., 2010).

Extensive researches have been conducted to evaluate the effects of soil compaction or heavy metals on soil physical properties and crop production (Chen Y. et al., 2014; de la Rosa et al., 2004; Grant and Bailey, 1997; Pengthamkeerati et al., 2011). Several studies have found decreases in microbial biomass and enzyme activity due to compaction and heavy metal pollution (Kelly et al., 2003; Landi et al., 2000; Pengthamkeerati et al., 2011; Tan et al., 2008) and others have found no relationship or positive response by microorganisms (Ikeda et al., 1997; Shestak and Busse, 2005). Enzyme activity was increased in presence of lead and catalase activity in the soil in presence of Cd and was also stimulated when Zn and Pb were added (Zhi-xin et al., 2006).

Previously, compaction or cadmium pollution effects on microbial biomass and enzyme activity has been studied separately. Hence, it is of great importance to carry out a study on the combined effects of soil physical changes and cadmium contamination on soil enzyme and microbe activities. Hence in the following study, we are investigating the effects of soil compaction, the presence of cadmium and phosphate fertilizer on four soil microbial population and three soil enzymes in the rhizosphere of *Lactuca sativa* (Lettuce) along different soil layers. Lettuce is used as a recommended plant for standard toxicity tests. Also, it is one of the most consumed leafy vegetables particularly in the eastern Mediterranean countries and qualified of high capacity of cadmium accumulation (Monteiro et al., 2009; Zorrig et al., 2010).

2. Materials and methods

2.1 Sampling site

Soil samples were collected in an arid region located at the West of Bekaa valley in Lebanon (33° 44' 17.2'' N, 35° 46' 49.8'' E). Elevation is approximately 905 m, and the average slope is less than 8%. The area has a mean annual precipitation of 850 mm, a mean temperature for the coldest month 2°C and 33°C for the warmest month (Hajar et al., 2010). The Bekaa region is known by its arid climate and a significant percentage of Luvisols soils or also called *Terra Rosa* (Darwish et al., 2004). Around 1500 hectares are annually cultivated with *Lactuca sativa* in this valley (Karam et al., 2002). Sampling site is chosen away from anthropogenic, agriculture and industrial activities. A mass of 700 kg of soil was collected from

a 50 m² area between 0 and 50 cm depth. Main physico-chemical properties and the total content of selected elements of the soil were followed by using standardized methods given in Table 1.

To determine Cd, Zn, Cu, Pb, Ca and Fe levels in the selected soil, samples were mineralized and digested using aqua regia media composed of nitric and hydrochloride acids (HNO₃: HCl_{v/v} 1:3). The concentrations were determined by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) using a Rayleigh WXF-210 AA Spectrophotometer. Acid blank samples were below the detection limit of the AAS indicating no contamination during the digestion procedure. Three replicate were done for each sample. All elemental analyses were made on the soil previously sieved at a 2 mm mesh.

2.2 Experimental design

Soil was air-dried at room temperature then ground, passed through a sieve (7 mm mesh) to remove coarse fragments and finally homogenized. A 2x2x2 factorial randomized block experimental design was performed with three replicate columns per treatment. Eight treatments were made by combination of two soil bulk density levels (i.e., 1.2 and 1.4 g.cm⁻³ for non-compacted (NC) and compacted soil (C) respectively), two rates of P₂O₅ amendment of 0 and 0.45 g, and two Cd rates of 0 and 150 mg. The P amount was obtained by addition of 2.5 g of single superphosphate fertilizer (18% P₂O₅), and Cd was added by using 268.6 mg of CdCl₂.H₂O (99.99%; Sigma-Aldrich). Soil preparations without P and Cd addition were used as control in the experimental design.

Cylindrical PVC tubes of 19.5 cm diameter and 45 cm height were used. PVC columns were filled with soils poured in three layers of 10 cm and then two layers of 5 cm according to Jusoff (1991) with the application of a pressure on the surface using a unidirectional force of a cylindrical rod of approximately the same diameter of the PVC tubes (Son et al., 2011). Homogenizing of soil, soil-phosphorous, soil-cadmium and soil-phosphorous-cadmium was done in a plastic bag before being transferred to the PVC columns. Soil mixtures are relative to the superficial layer of soil column, the first 5 cm of column that is equivalent to 1.79 Kg and 2.09 Kg of soil for NC and C soil respectively.

After germination for two weeks, lettuces plants (*Lactuca sativa*) were 6 cm height with 3 leafs each and were allowed to grow in the PVC cylinders of different treatments under controlled conditions. Room temperatures were set to 21/19°C day/night, 12 hours of light

period and 60-70% of air humidity. A controlled mineral water was used for irrigation from the top of the columns three times a week to provide 250 mL per irrigation. No symptoms of diseases were observed in the period of plant growth. After growing for 77 days, all plants were harvested, the cylindrical PVC columns were sacrificed and the soil cores were subdivided in six different layers (0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm, 15-20 cm, 20-30 cm and 30-40 cm).

2.3 Biochemical analyses

Samples were taken from each mentioned soil layers and from the rhizosphere. The soil adjacent to plant roots was extracted by gentle tapping and is considered as soil rhizosphere fraction (R). These samples were used to study the effects of cadmium, superphosphate and soil compaction on microbial populations and enzymatic activities by controlling the following parameters.

2.3.1 Microbial population A 10 g amount of soil samples is suspended in 100 mL of a dispersing solution of NaCl 9‰ (99.5%, Acros) and agitated for 30 minutes. Suspensions are settled for 20 minutes and supernatants are 10 times diluted. Dilution series, from 10^2 till 10^7 , are conducted by repeating transferring aliquots of 1 mL of each generated suspension in 9 mL of fresh dispersing solution of NaCl. Inoculation was made on several agar plates in duplicates. For the enumeration of total bacteria, total fungi, cadmium resistance bacteria and microorganism solubilizing the phosphate, inoculated agar plates were incubated for ten days at 28°C in the Labtech incubator.

Enumeration of total bacteria (TB) was done by culturing on nutrient agar medium (NA) (Oxoid) following serial dilution-spread plate method. An antifungal antibiotic, the amphotericin B (80%, Sigma) was added to the medium after autoclaving at 121°C for 30 min and cooling to 50-60°C to inhibit and stop the fungi growth.

Total fungi (TF) were cultured on Martin's Rose Bengal agar medium (Oxoid). The medium was prepared by autoclaving at 121°C for 15 minutes. After cooling to 45°C, this medium was supplemented with 30 mg/L streptomycin (1 mg/mL in 1 mM EDTA, Fluka), an antibiotic that inhibits bacterial growth and excessive spreading of certain types of fungi. Then fungi were counted after ten days of incubation at 28°C according to Gao et al. (2010) method.

Cadmium resistant bacteria (CRB) were isolated using Luria Bertani (LB-Agar, high salt, Fluka) agar medium supplemented with 500 µmol/L CdCl₂. Similarly, amphotericin B solution was added to this medium to inhibit and stop the growth of fungi.

Phosphate solubilizing microorganisms (PSM) are able to solubilize inorganic phosphate compounds. PSM were isolated on Pikovskaya's agar medium (PVK) in duplicates and form clear zones on the medium after 10 days of incubation at 28°C.

2.3.2 Enzyme activities measurements Phosphomonesterases are exoenzymes of special importance for nutrients supply to plants (Buck et al., 2000). Acid and alkaline phosphatase activities were assayed using para-nitro-phenyl phosphatase (*p*NPP) as an orthophosphate monoester analogue substrate. In a 50 mL content flask, a 1 g amount of soil was suspended and agitated for few seconds in 4 mL of THAM (Tris-hydroxymethyl-aminomethane, with citric, maleic and boric acids) ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich), buffered at pH 6.5 for acid phosphatase and pH 11 for alkaline phosphatase and 1 mL of *p*NPP. The flask was then closed with a stopper and incubated for an hour at 37°C. The stopper was removed and a volume of 1 mL of CaCl₂ (0.5 M) and 4 mL of NaOH (0.5 M) was added to the content. The flask was swirled for seconds to stop the reaction and the soil suspension was filtrated on nitrocellulose membrane of 0.45 μm (Millipore). Each sample preparation was duplicated and standards of 0, 10, 20, 30, 40 and 50 ppm of *p*-nitrophenol were prepared. The intensity of yellow color in the calibration standards and samples was measured with a spectrophotometer Spectronic 20 Genesys at a wavelength of $\lambda = 398$ nm against the reagent blank. Then the *p*-nitrophenol content in soil samples was deduced by referring to the calibration curve. Afterwards, the phosphomonoesterase activity was expressed as mg *p*-nitrophenol (*p*NP) per gram dry matter of soil and incubation time (hours) (Sardans et al., 2008).

Dehydrogenase is an endoenzyme used as an indicator of general microbial activity (Buck et al., 2000). Dehydrogenase activity was determined using the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) method in the trephenylformazan (TPF). This product is then extracted by methanol. A 6 g of soil sample is mixed thoroughly with 60 mg CaCO₃ then transferred in 3 tests tubes (1.6 internal diameter and 15 cm height). To each tube, 1 mL of TTC solution (3%) (Fluka) and 2.5 mL of deionized water were added. Tubes contents were mixed on the vortex, sealed with a stopper and incubated for 24 hours at 37°C. The TPF is then extracted by adding 10 mL of methanol to the soil suspension and shaking for 1 minute. The content of the three tubes were collected in a 50 mL Erlenmeyer flask after filtration on Whatman # 42 filter paper. The funnel of filtration and the tubes were washed with methanol until the red color disappeared and the filtrate was diluted to 100 mL with methanol. Finally,

the red color intensity was measured using the Thermo Spectronic 20 Genesys spectrophotometer at $\lambda = 485$ nm with methanol as a blank. Samples were analyzed in duplicate, the standards contained 5, 10, 15, 20, 25 and 30 μg of TPF/mL and the dehydrogenase activity was expressed as g TPF per gram dry matter of soil (Sardar et al., 2007; Gao et al., 2010).

All the data reported represent an average of two or three replicates with standard deviation. SPSS software version 17.0 was used to treat the data. Duncan's multiple range test ($\alpha=5\%$) was performed to indicate significant difference in microbial populations and enzymatic activities for soil layers of different treatments.

3. Results and discussion

3.1 Soil Characteristics

The soil selected is a typical Mediterranean clay soil of moderate electrical conductivity $1157 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, and of very low content of OM (2.08%) and total calcareous (about 1.4%) which is characteristic to alkaline soil pH (8.21) (Table 1). Accordingly, clay-OM complexes are expected to be very low where soil compaction may take place easily and affect capillarity and water availability to roots (Kooistra et al., 1992). It is a soil of medium to fine texture with high clay content (53%) and CEC of $19 \text{ meq}\cdot 100\text{g}^{-1}$ of soil. Contents of Zn, Cu, Pb and Cd are under the European maximum allowed limits (Table 1). Iron high level is expected since it is a clay terra Rosa Mediterranean soil.

Table 1 Main physico-chemical properties of the studied soil.

	Soil content	Method used
Sand (%)	26.9	Bouyoucous hydrometer method (Thien and Graveel, 2003)
Silt (%)	20.1	
Clay (%)	53	
pH	8.21 ± 0.01	X 31-117 (NF ISO 10390)
Organic matter (%)	2.08 ± 0.02	ASTM D 2974
CEC ^a (meq.100 g ⁻¹) †	19.23 ± 1.16	NF-X 31-108
Conductivity (µS.cm ⁻¹)	1157 ± 23	X 31-113 (NF ISO 11265)
Total Calcareous (%)	1.39 ± 0.17	EN ISO 10693
Total content of trace elements (mg.kg ⁻¹) ‡		
	Soil content	European maximum limit
Cd	1.5 ± 0.05	1.5
Cu	26.09 ± 0.6	100
Pb	27.05 ± 0.51	100
Zn	98.58 ± 8.9	200
Fe	33230 ± 925	-

Mean values ± SD, n = 3. Analyses were made on the soil previously sieved at 2 mm
† CEC is the cation exchange capacity
‡ Method used for total content of trace elements is the ISO 11466:1995

3.2 Cadmium behavior in soil profile

Almost the same concentrations of Cd were observed in the different layers of non-contaminated soil (C and NC) and soil amended by the fertilizer (P-C and P-NC) (Table 2). As for cadmium contaminated soil (Cd-C and Cd-NC), Cd content in the top layer 0-10 cm is clearly greater than the geochemical background, whereas a clear difference of cadmium content in soil can be seen between compacted and non-compacted soil in the layer 5-10 cm depth. The same cadmium behavior is observed in soil treated with Cd and P (Cd+P-C and Cd+P-NC) where cadmium was mainly concentrated in the upper 10 cm of the soil columns after 77 days. Beyond this layer, cadmium geochemical background is restored at about 2.5 mg/Kg. Also a difference between compacted and non-compacted soil is observed in the layer 5-10 cm and the Cd contents were 3.28 and 10 mg/Kg for Cd+P-C and Cd+P-NC respectively (Table 2).

Cadmium behavior in the soil layers is mainly related to the soil density as well as to phosphate content in the upper layer of the soil. Compaction and phosphate together inhibited the cadmium migration along the column. When soil is treated with phosphate, P-Cd complexes can be formed (Bolan et al., 2003; Hong et al., 2008) and immobilize the available Cd reducing

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate
fertilizer

its migration to the 5-10 cm layer. However, compaction with or without phosphate treatment is considered as a physical barrier that enhances metal retention in the upper soil layers.

Table 2 Total concentrations of Cd in different layer of soil columns.

Depth (cm)	Treatments							
	C †	NC ‡	Cd-C §	Cd-NC #	P-C ††	P-NC ††	Cd+P-C §§	Cd+P-NC ##
0-5	2.52 ± 0.22	2.26 ± 0.24	50.25 ± 3.85	52.57 ± 5.33	2.31 ± 0.05	2.7 ± 0.27	47.19 ± 0.74	48.91 ± 2.3
5-10	2.48 ± 0.21	2.42 ± 0.13	17.73 ± 0.94	35.63 ± 3.45	2.48 ± 0.38	2.47 ± 0.2	3.28 ± 0.02	10.04 ± 0.73
10-15	2.88 ± 0.6	2.32 ± 0.05	2.83 ± 0.43	2.66 ± 0.28	2.14 ± 0.04	2.38 ± 0.34	1.92 ± 0.07	2.67 ± 0.3
15-20	2.56 ± 0.16	2.38 ± 0.15	2.72 ± 0.27	2.41 ± 0.21	2.08 ± 0.17	2.46 ± 0.27	2.11 ± 0.17	2.71 ± 0.32
20-30	2.43 ± 0.27	2.46 ± 0.04	2.59 ± 0.24	2.48 ± 0.36	2.29 ± 0.001	2.37 ± 0.16	2.06 ± 0.23	2.17 ± 0.07
30-40	2.32 ± 0.18	2.41 ± 0.01	2.59 ± 0.29	2.37 ± 0.41	2.09 ± 0.11	2.45 ± 0.48	2.04 ± 0.23	2.41 ± 0.58

† (C) Compacted soil

‡ (NC) Non-compacted soil

§ (Cd-C) Compacted soil amended with cadmium

(Cd-NC) Non-compacted soil amended with cadmium

†† (P-C) Compacted phosphatized soil

‡‡ (P-NC) Non-compacted phosphatized soil

§§ (Cd+P-C) Compacted soil amended with Cd and phosphate

(Cd+P-NC) Non-compacted soil amended with Cd and phosphate

3.3 Microbial population in soil profile

The total bacteria count was found the highest between the microbial populations (total bacteria, fungi, CRB and PSM) analyzed. The lowest number of total bacteria (5.8×10^4 CFU TB.g⁻¹ soil) among the different treatments and soil layers was higher than the best values found for fungi (586 CFU TF.g⁻¹ soil), for phosphate solubilizing micro-organisms (8.5×10^3 CFU SPM.g⁻¹ soil) and cadmium resistant bacteria (4.6×10^2 CFU CRB.g⁻¹ soil) (Figs. 1, 2, 3 and 4).

Lower microbial populations (bacteria, fungi, CRB and PSM) occurred in compacted soils. Soil bulk density has led to a significant decrease by an average of 18, 13, and 37% of the number of bacteria, fungi and PSM respectively (Figs. 1a, 1b and 1c) and a non-significant decline of the number of CRB (Fig. 1d). The significant decrease of the number of bacteria and fungi was observed in the layer 5-10 cm where it reached 32 and 18% respectively for both microbial populations (Figs. 1a and 1b). This is attributed to changes in soil physical properties including the decrease of soil total porosity and reduction of root growth which may limit the rhizosphere expansion in response to the increase of soil bulk density.

Total bacteria counts, fungi and PSM seem to be likely decreased along the soil profile, in both compacted and non-compacted soil, with the highest population number in the top layer of NC soil (0-5 cm), which was as much as the double of the deepest layer (20-30 cm). However, less dramatic decreases are observed along the last layers (Fig. 1). This is due to the lack of nutrients, organic matter and aeration with increasing in depth resulting in limiting or modifying microorganism diversity. The greatest root length of lettuces was observed in non-compacted soil. Therefore, soil compaction may reduce crop growth, root development and penetration rates, leading to a negative feedback on plant performance and soil microbiological properties (Pengthamkeerati et al., 2011; Son et al., 2011). This negative effect of compaction was observed by Canbolat et al. (2006) and Li et al. (2002) who found a decrease of total bacteria and fungi with increasing soil density.

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

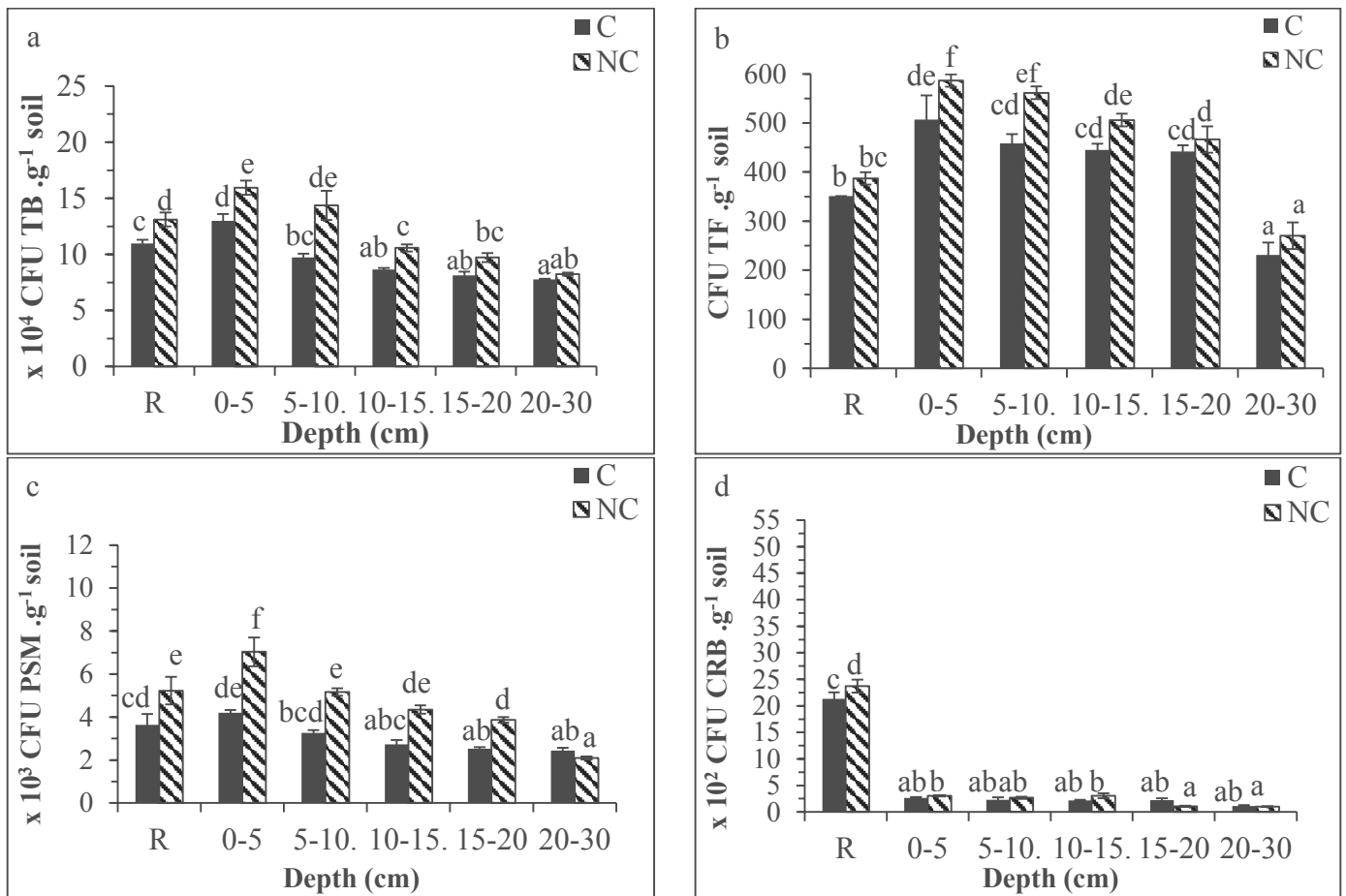


Fig. 1 Count of Total Bacteria (TB), Total Fungi (TF), Phosphate Solubilizing Micro-organism (PSM) and Cadmium Resistant Bacteria (CRB) in the rhizosphere and the different layers of Compacted (C) and non-compacted (NC) soil.

As for cadmium resistant bacteria, another trend was observed (Fig. 1d). Higher colony counts were reached in the rhizosphere with a reduction of 87% of the bacterial count in the superficial layer (0-5 cm) with no differences among the subsequent layers due to the bacteria's ability to adapt to new soil conditions and to the non-detrimental effect of compaction to microbial community characteristics (Nannipieri et al., 2007; Pupin et al., 2009; Shestak and Busse, 2005).

For all the mentioned bacterial populations, their count on the rhizopheric (R) area of non-compacted soil was higher than in compacted soil. A relatively higher percentage by 16, 9, 30 and 11% was observed for the count of total bacteria, fungi, PSM and CRB respectively in the R of NC compared to those in R of C soil.

Several authors had mentioned that bacterial count in soil is influenced by the texture, pH and CEC of the soil and soil nutrients (Chu et al., 2007; Feng et al., 2014; Urbanova et al., 2015).

It also depends on the exudates released by plant roots and associated microbes and it is influenced by the total content of heavy metals in addition to the soil type (Garau et al., 2007; Hattori, 1992; Wenzel et al., 1999). Clay minerals in soil, known with their high CEC, can reduce the toxicity of cadmium by immobilizing high amount of bioavailable cadmium thus a no inhibition growth effect on certain bacteria, actinomycetes and filamentous fungi in rich clay soil which is the case of the studied soil (Brennan et al., 2014; Gadd and Griffiths, 1978; Lorenz et al., 2006).

Like the compaction effects, soil bacterial community composition was altered and reduced by cadmium addition. Bacteria showed 8 and 14% of reduction in compacted and non-compacted soil respectively compared to the control (Figs. 2a and 2b). Fungi, PSM and CRB responded similarly to bacteria but fungi were found more sensitive. This is in contradiction to previous results where fungi were found more resistant to cadmium than bacteria and increased in sandy contaminated heavy metal soil (Hattori, 1992; Pan and Yu, 2011; Vig et al., 2003). However our results suggest that cadmium is inhibiting fungal growth without showing significant differences relatively to the depth or the state of compaction (Fig. 2b). The decrease in the fungi counts may be due to the impact of cadmium on the root of lettuces leading to an inhibition of mycorrhizal fungi that may have accounted for the observed decrease in fungi count (Hinojosa et al., 2005; Kelly et al., 2003). This behavior was observed in zinc and cadmium contaminated soil in Finland where the fungi decreased with metal contamination (Kelly et al., 2003). In compacted and cadmium contaminated soil, PSM increased with depth to fall down in the deepest layer whereas in non-compacted soil always with cadmium, PSM decreased significantly across the layers but still higher than the control of non-compacted soil (Figs. 1c and 2c). This opposite change can be attributed to the difference of Cd behavior in the two bulk densities or to the production of organic acids. In fact, Cd level was found higher in compacted soil than in non-compacted soil (Table 2) moreover the PSM produce organic acids like acetic, lactic, isovaleric and succinic after mineral phosphate dissolution. The low molecular weight of organic acids are able to lower the pH and through their hydroxyl and carboxyl groups chelate the cations to phosphate, the latter being converted to available and soluble forms (Jeong et al., 2012; Vazquez et al., 2000).

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

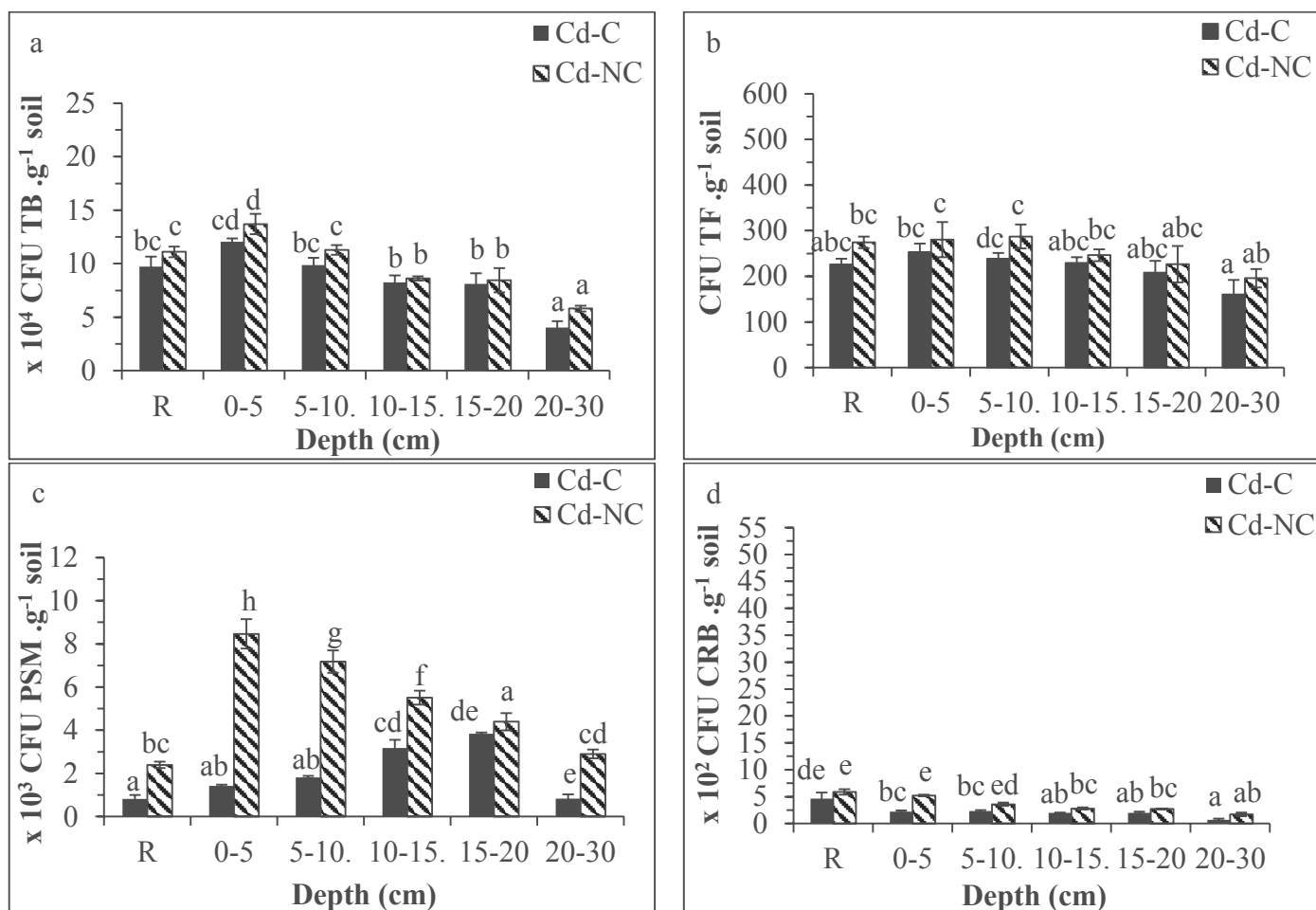


Fig. 2 Count of Total Bacteria (TB), Total Fungi (TF), Phosphate Solubilizing Micro-organism (PSM) and Cadmium Resistant Bacteria (CRB) in the rhizosphere and the different layers of Compacted and non-compacted soil amended with cadmium (Cd-C) and (Cd-NC).

As for CRB, the count was found in its highest growth in the rhizosphere with a reduction of an amount superior to 75% compared to the control in both C and NC soil. This number decreases also significantly with depth in non-compacted soil but less significantly in compacted soil (Fig. 2d) but the values in non-compacted soil was higher than the one found in the control (Fig. 1d). These bacteria resist and tolerate the cadmium presence probably by biosorption, accumulation or by converting it into less toxic form.

The bacterial populations in the phosphate treated soils were superior to those of the control almost at all depths emphasizing a role of phosphate as a main nutrient regarding bacterial population growth. The highest number was found in the non-compacted rhizospheric soil (P-NC), while the lowest number was found in the deepest layer (20-30 cm) of the compacted one (P-C) and the count declined along soil layers (Fig. 3a). The fungi count in the treated soil with

phosphate (Fig. 3b) was different than the control (Fig. 1b) and was less but with no significant variation or effect of phosphate in the NC soil which is in agreement with Wakelin et al. (2012). This was in contrast to expectations because phosphorus is essential for microbial populations growth and might be due to an inhibitory effect of the superphosphate used (Lima et al., 1996). In the compacted soil, where the root development was diminished, the fungi count was different and less than in the control soil. The amount of total fungi was similar in all the layers except the lowest two. Nonetheless, a significant difference was observed between compacted and non-compacted treatments with high level in NC soil (Fig. 3b). A remarkable increase of PSM number was observed compared with the control, 61 and 49% in the rhizospheric zone (R) and 38 and 16% in the upper layer of both compacted and non-compacted soil respectively. Such increase is still ambiguous in the literature. Previous studies revealed the increase of PSM count when organic and inorganic phosphate were added while others found no effect on PSM count when phosphate fertilizer was added (Hu et al. 2009; Mander et al., 2012; Wakelin et al, 2012). Greatest numbers of microorganisms were isolated in the rhizospheric zone (Figs 1c and 3c). This number decreased notably with depth in both soil bulk densities (Fig. 3c). In all the treatments, PSM count was most dominant in the upper layer (0-5 cm) except in this case when phosphate fertilizer was added.

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

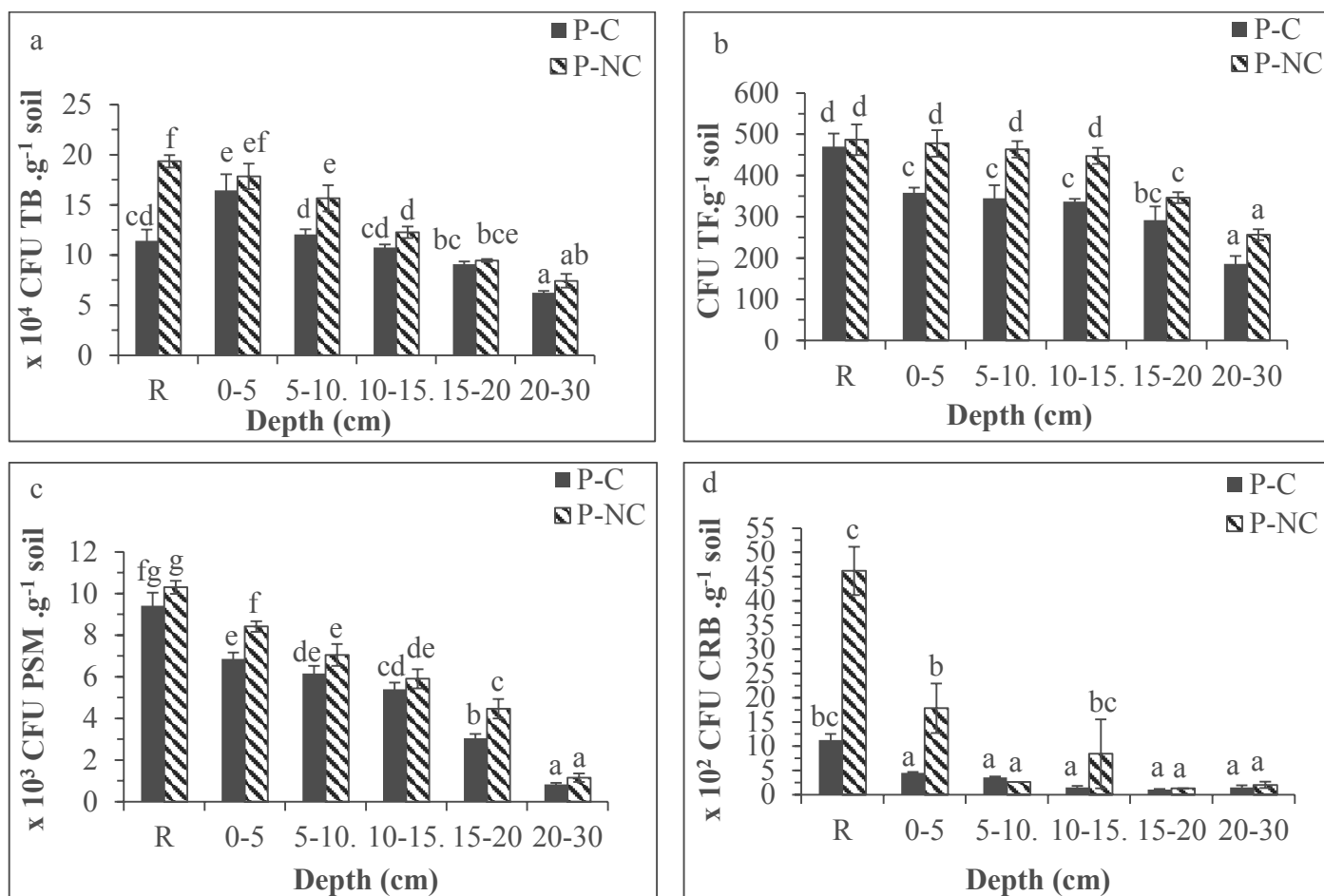


Fig. 3 Count of Total Bacteria (TB), Total Fungi (TF), Phosphate Solubilizing Micro-organism (PSM) and Cadmium Resistant Bacteria (CRB) in the rhizosphere and the different layers of Compacted and non-compacted phosphatized soil (P-C) and (P-NC).

In addition to the increase of PSM in presence of phosphate, an increase of cadmium resistant bacteria number was also observed, 41 and 83% in the upper layer of both compacted and non-compacted soil respectively. CRB reached its highest level in non-compacted rhizospheric soil (46×10^2 CFU.g⁻¹ soil), followed by non-compacted top layer (0-5 cm) (18×10^2 CFU.g⁻¹ soil) and rhizospheric compacted soil (11×10^2 CFU.g⁻¹ soil) (Fig. 3d). Then the population tends to decrease with a not significant difference between the consecutive layers. Between all the treatments, the CRB proliferation was the highest in presence of cadmium than in presence of phosphate comparing to the control (Fig. 1d). This in turn is partly due to the ability of some CRB to adapt in presence of phosphate (Canbolat et al., 2006; Sharma et al., 2011).

On the one hand, in phosphate amended soil, a better performance of microbial populations and plant growth was noticed because all the microbial populations were developed in great

amount. In fact, it is due to the development of the root system where more root exudates become available to soil microorganisms and to the contribution of phosphate solubilizing bacteria in solubilizing and making P available to plant nutrition (Chu et al., 2007; Rodríguez and Fraga, 1999). On the other hand, cadmium had negative effect on soil micro-organisms count in inhibiting bacterial, fungi, and PSM growth except for CRB which is completely expected. Thus, an antagonist effect of cadmium and phosphate on microbial populations is demonstrated, still to evidence their combined effects when applied together to the compacted and non-compacted soil.

Compaction had no significant effect on microbial population with higher counts in non-compacted soil in presence of cadmium and phosphate together. Microbial population diminished with increasing soil depth, e.g. total bacteria counts decreased by 36 and 30% from the layers (0-5 cm) to (5-10 cm) and (5-10 cm) to (10-15 cm) respectively in compacted soil and 31 and 21% from the layers (0-5 cm) to (5-10 cm) and (5-10 cm) to (10-15 cm) respectively in non-compacted soil (Fig. 4a). Values found were less than the control especially in the layers (0-5 cm) and (5-10 cm) in a significant way in compacted soil and in a non-significant way in NC soil (Figs. 1a and 4a). In this treatment, the number of total bacteria was less than the number found in cadmium contaminated soil and the one in phosphatized soil despite the bulk densities (soil with Cd+P < soil+Cd < soil+P). The constructive effects of the phosphate were canceled by cadmium. This may be due to the toxic effects of Cd on microbial population and on root system of the plant. Lower effects of Cd-P on certain microorganisms may be due to a formation of unavailable form (Lambert et al., 2007).

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

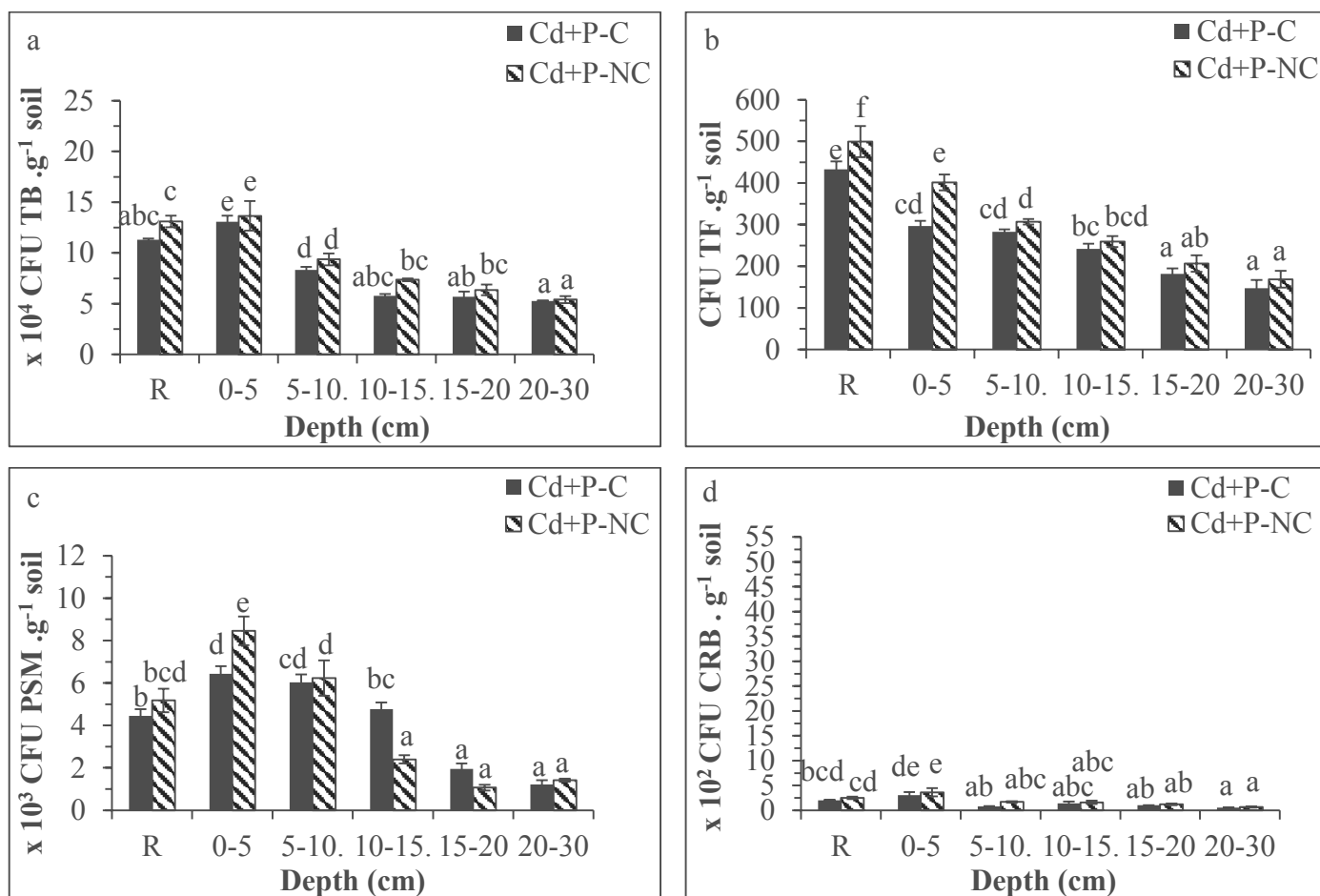


Fig. 4 Count of Total Bacteria (TB), Total Fungi (TF), Phosphate Solubilizing Micro-organism (PSM) and Cadmium Resistant Bacteria (CRB) in the rhizosphere and the different layers of Compacted and non-compacted soil amended with Cd and phosphate (Cd+P-C) and (Cd+P-NC).

Fungi were the highest in the rhizospheric zone and decreased with soil depth. The variation of fungal population was more visible and significant in non-compacted soil of the first two soil layers and the rhizosphere of *L. sativa*. The number of fungi was less by 13, 25 and 8% in the rhizosphere, the layers 0-5 cm and 5-10 cm respectively in compacted soil compared with non-compacted soil (Fig. 4b). In comparison with the other treatments, the highest number of fungi was observed in the control than in the phosphatized soil than in the combination of Cd and P and the lowest growth was found in treated cadmium soil.

PSM had different behavior in combined treatments. A significant reduction of PSM was observed after applying compaction only in the top layer (0-5 cm), and a decrease of this number with depth in both compacted and non-compacted soil. It is worth mentioning here, that in soil profile 10-15 and 15-20 cm, there was higher PSM in compacted soil, but it is still

thought-out as a non-significant one (Fig. 4c). In both bulk densities, the number of PSM in combined treatment is higher in the rhizosphere and the first three layers than the one in the control (Figs. 1c and 4c). The competition between Cd and P has led to such results. Nonetheless, CRB reached their highest values in the layers (0-5 cm) followed by rhizosphere, with diminutive difference in the other layers with no significant differences with soil bulk density (Fig. 4d). The constructive effects of the phosphate were also masked by the cadmium except in the layer (0-5 cm).

3.4 Enzyme activities

The effects of different soil treatments (soil bulk density, cadmium and superphosphate fertilizer addition) were also studied on the activity of the alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase and dehydrogenase (DHA).

In this study, the soil has an alkaline pH, thus, it is normal to find that alkaline phosphatase activity has exceeded acid phosphatase activity in both soil bulk densities (Table 1, Figs 5a and 5b). Compaction has a tendency to reduce ALP and acid phosphatase activity in different ways. On the one hand, it has led to a significant decrease of ALP activity in the rhizosphere by about 24% compared with non-compacted rhizospheric zone (Fig. 5a). The activity of ALP reached its highest level in non-compacted layer 0-5 cm, and then declines without showing great differences with soil depth. The decrease of ALP activity is coupled to the decrease of the total bacteria and fungi number with soil compaction because these microbes can produce large amounts of ALP (Figs. 5a and 5b) (Krämer and Green, 2000; Pupin et al., 2009). Although the difference was not significant, the activity was still privileged in non-compacted superior layers (Fig. 5a). On the other hand, the activity of acid phosphatase in the layers 0-5 and 15-20 cm of compacted soil was 27 and 22% respectively lower than in non-compacted soil layers (Fig. 5b).

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

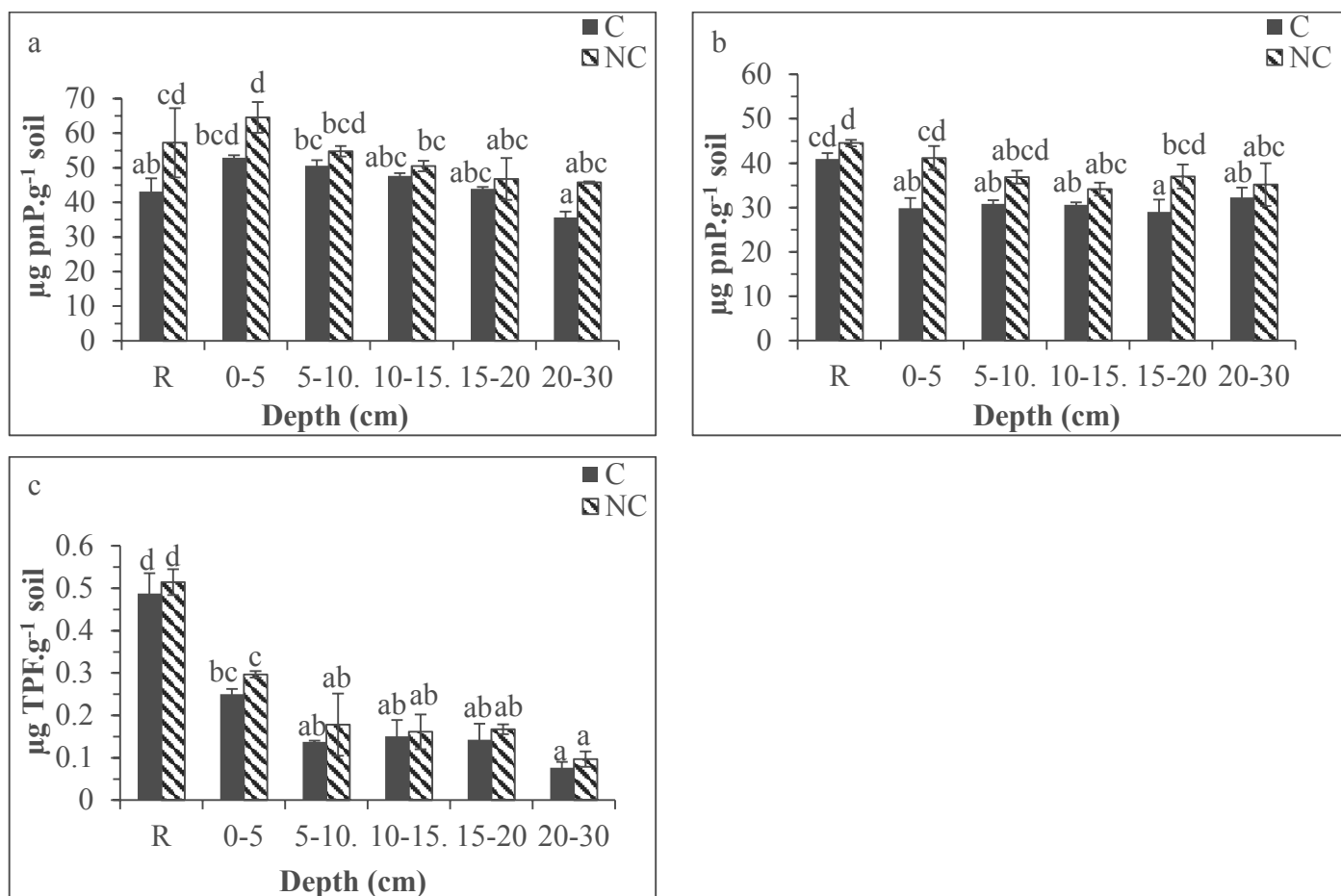


Fig. 5 Activities of a) Alkaline phosphatase, b) Acid phosphatase and Dehydrogenase in the rhizosphere and different layers of compacted (C) and non-compacted soil (NC).

The activity of acid phosphatase was the highest in non-compacted rhizosphere and it decreased with soil depth till the layer 10-15 cm where it rises again in the last two layers. The fluctuation of this enzyme activity was not significant with the increase in depth (Fig. 5b) but the decrease is explained by the reduction of aeration porosity and reduced roots since plant roots are major producers of acid phosphatase (Krämer and Green, 2000; Li et al., 2002; Tan et al., 2008) and the increase of this enzyme activity is due to the favorable conditions for colonization with decomposer microflora on the basis of closer contact of mineral and plant particles (Buck et al., 2000).

Acid phosphatase activity was found more sensitive to soil compaction than alkaline phosphatase activity because acid phosphatase is related to root growth activity and plant demand for phosphorus. Phosphatase activity is related to soil and vegetation conditions, seasonal changes in soil temperature, moisture and pH. In arid soils in India, alkaline

phosphatase activity was found significantly higher with fungal communities under trees than under grass (Dick et al., 2000; Krämer and Green, 2000).

Dehydrogenase (DHA) activity wasn't affected by soil compaction in all the soil layers (Buck et al., 2000; Tan et al., 2008). This activity reached its highest level in the rhizosphere of non-compacted soil which is higher by 5.17% than the one in the rhizospheric zone of compacted soil. The enzyme performance decreased with soil depth significantly in the top two layers and non-significantly in the bottom layers (Fig. 5c). In the present study, the soil is alkaline and arid, thus a remarkable decrease of the DHA activity with depth is observed since water becomes less available. In addition, this behavior is attributed to the availability of organic carbon and nutrients in the surface soil because it is obvious that enzymatic activities increased with increasing soil organic carbon and the highest organic matter was found in the surface soil horizon in previous studies (Velmourougane et al., 2013; Yuan and Yue, 2012). DHA activity was found less sensitive to compaction compared to ALP and acid phosphatase activities.

Crop growth had minimized the effects of soil compaction, thus a non-significant difference in enzyme activities in general between soil bulk densities. Lettuces roots were less important in compacted soil compared with non-compacted soil but in a non-significant way (results not showed). Thus, these roots can penetrate into soil decreasing soil strength and density and increasing soil organic matter and soil microbial growth and activity. It is not surprising to find high performance of the enzymes in the rhizosphere compared with other soil layers because, as mentioned before, the rhizosphere is influenced by the growth and activity of the root and the micro-organisms are stimulated by the activity of these roots.

When cadmium was added, ALP, acid phosphatase and DHA activities had different trends (Fig. 6). In general, soil enzymes diminish with the increased availability of heavy metals (Wang et al., 2007) but cadmium concentration in soil solution is reduced at neutral and alkaline pH. The activity of ALP dropped in both compacted and non-compacted soils compared with the control (Figs. 5a and 6a). A significant declination was observed in the rhizosphere of non-compacted soil. The highest activities occurred in the rhizospheric zone of the compacted soil. The activity increased with an increase in soil depth with non-significant manner and no statistical significance between soil bulk densities except in the rhizosphere (Fig. 6a). The negative effect of cadmium on ALP production may be explained by the inactivation of the ALP reactive sites when bonded to cadmium, then metabolism and ALP production is interrupted (Vig et al., 2003). Nevertheless, cadmium contaminated soils contain

lower levels of enzyme activities such as ALP, arylsulphatase and protease activities compared with unpolluted soils (Aghababaei et al., 2014; Renella et al., 2004; Zhi-xin et al., 2006).

Unlike ALP activity, the acid phosphatase activity increased in presence of cadmium. This increase was observed in the first three layers (0-15 cm) and then decreased again in the last two layers with non-significant manner between soil bulk densities except in the rhizosphere (Fig. 6b). The increase might be due to the decrease of pH following cadmium addition, the presence of microbial population that can change pH and the root exudates that can lower the pH by one or two units in the rhizosphere over that in bulk soil, thus a better performance of acid phosphatase in less alkaline soil (Vig et al., 2003). Our result is in contradiction with other studies where acid phosphatase activity was found inhibited in presence of heavy metals (Gao et al., 2010, Pan and Yu, 2011; Sardar et al., 2007) or cadmium in maize soils had no effect on the acid phosphatase, β -glucosidase and urease activities (Renella et al., 2004). Clay is the major content in our soil that decreases the cadmium toxicity followed by organic matter content.

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

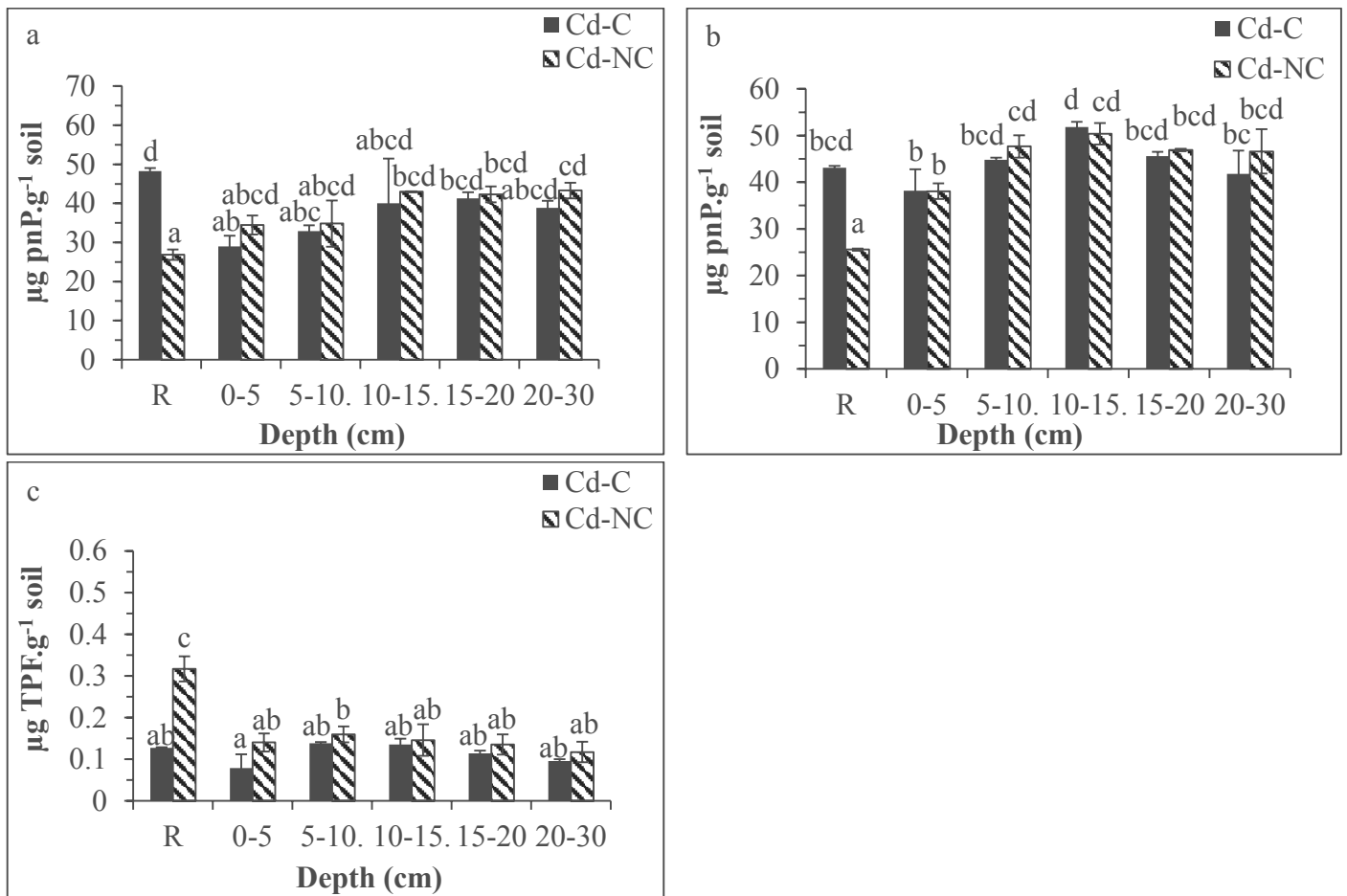


Fig. 6 Activities of a) Alkaline phosphatase, b) Acid phosphatase and Dehydrogenase in the rhizosphere and the different layers of Compacted and non-compacted soil amended with cadmium (Cd-C) and (Cd-NC).

Like the ALP activity, cadmium has reduced the performance of DHA compared with the control (Gao et al., 2010; Vig et al., 2003) (Figs. 5c and 6c). DHA activity increased in both soils in the first three layers (0-15 cm) then decreased with increasing soil depth with the highest activity value in the rhizosphere of non-compacted soil (Fig. 6c).

In the case of ALP and DHA activities, cadmium reduced enzyme activity by complex formation with the substrate, denaturing the enzyme protein or interacting with the protein-active groups. This heavy metal has shown the capability to react with sulfhydryl groups causing an inhibition or inactivation of enzyme activity (Lorenz et al., 2006; Pan and Yu, 2011; Vig et al., 2003; Zhi-xin et al., 2006). However, some authors states that the decrease in enzyme activities is related to the suppression of the microbial population growth in the contaminated soil (Kuperman and Carreiro, 1997). In general, the effects of cadmium on the enzyme activity in the rhizosphere are more complex than in bulk soil due to the larger amount of trace metal

ligands, acidification and root trace metal uptake (Egamberdieva et al., 2011). Therefore, cadmium toxicity varied with the studied enzymes.

In presence of phosphate fertilizer, the activity of ALP and acid phosphatase was not significantly different between compacted and non-compacted soils with higher values in non-compacted soils (Figs. 7a and 7b). ALP activity wasn't higher in presence of phosphate compared with the control sample of alkaline soil (Figs. 5a and 7a) but acid phosphatase activity had a better performance in both soil bulk densities, compared with the control (Figs. 5b and 7b).

Acid phosphatase is exuded by plant roots, thus its amount is affected by the crop variety. For instance, legumes, such as lettuces in this study, secrete more phosphatase than cereal, which could be due to a higher requirement of P by legumes as compared to cereals. For both enzymes, activities decreased in first three layers (0-15 cm) then increased in the bottom layers with no-significant explanation (Figs. 7a and 7b). In contrast with the effect of cadmium, the phosphate fertilizer increased the activity of DHA that was the highest in the rhizosphere of P-NC and the top layers of P-C and P-NC (more than $0.36 \mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$ soil). This activity was then decreased with further increase in soil depth in a non-significant way from the layers 5-10 cm to the deepest layer (Fig. 7c). Therefore, the phosphate fertilizer has positive effects on DHA which performance is linked to better plant and microbial growth conditions (Chu et al., 2007; Lima et al., 1996; Zhao et al., 2010).

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

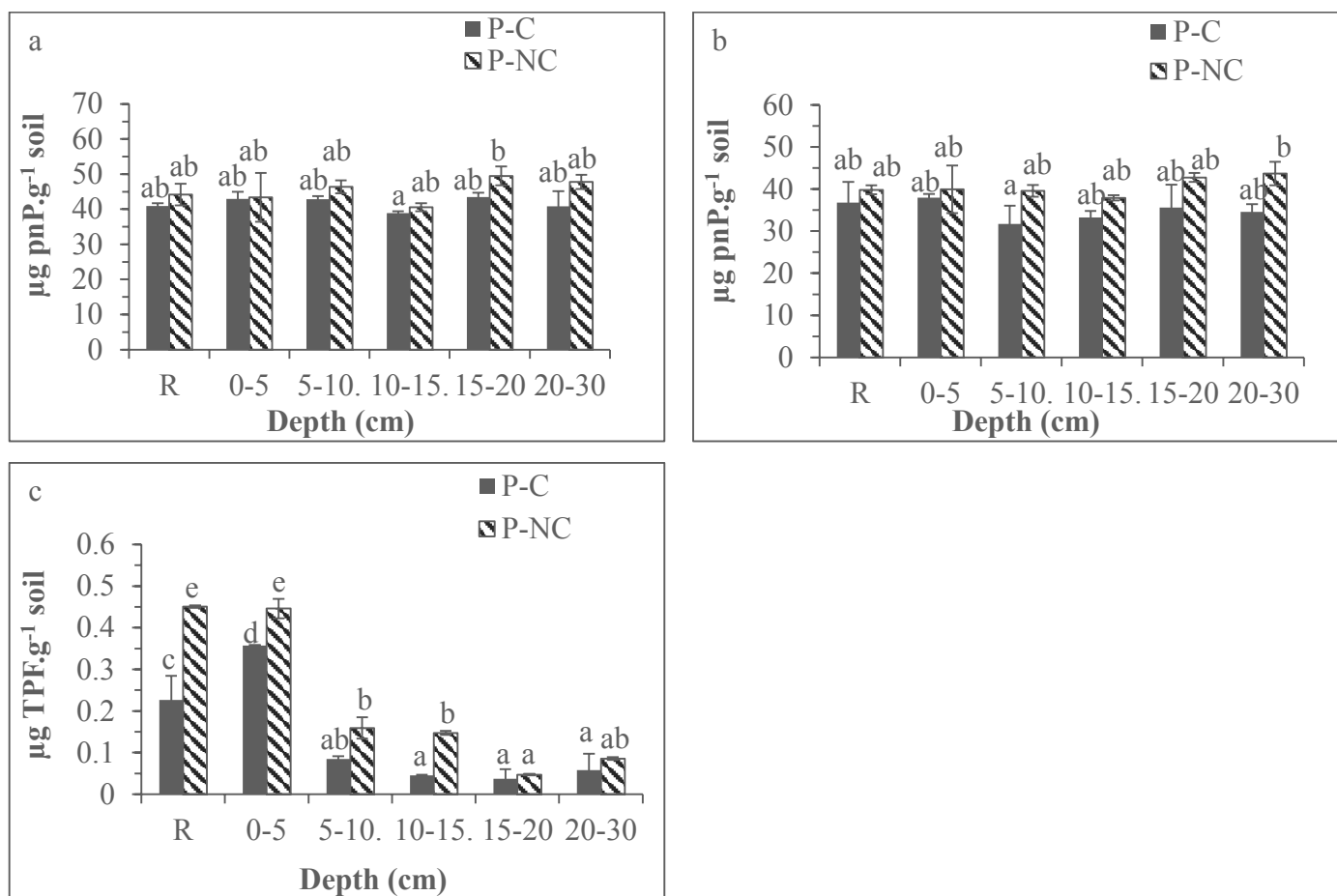


Fig. 7 Activities of a) Alkaline phosphatase, b) Acid phosphatase and Dehydrogenase in the rhizosphere and the different layers of Compacted and non-compacted phosphatized soil (P-C) and (P-NC).

Studies on the influence of heavy metals, compaction or phosphate addition on enzymes activities were made previously in sandy soil. This is the reason why it was of high interest to combine all these treatments together to understand the behavior of ALP, acid phosphatase and dehydrogenase activity in alkaline and arid soil. In the combined treatment, where phosphate fertilizer and cadmium were added together to the soil, the activity of ALP, acid phosphatase and DHA (Fig. 8) had similar trend as the control sample for each enzyme activity (Fig. 5). As mentioned previously, ALP activity was lower in presence of cadmium and phosphate separately compared with the control. In presence of cadmium and phosphate together, this activity was also lower than the control (Figs. 5a and 8a). ALP activity was slightly higher in non-compacted than in compacted soil but decreased from the layer 0-5 cm till the layer 10-15 cm to increase in the last two layers but in a non-statistical explanation (Fig. 8a). This activity, in combined treatment, was lower than the control but higher than in presence of cadmium

Microbial biomass growth under cadmium input into alkaline soil amended with phosphate fertilizer

alone and almost equal to the activity in presence of phosphate fertilizer alone. Thus, in this case, the negative effect of cadmium was inhibited in presence of phosphate. Acid phosphatase activity had a better performance in presence of cadmium and phosphate separately. In combined treatment, acid phosphatase activity was almost the same as the control with the highest activity in the rhizosphere (Fig. 8b).

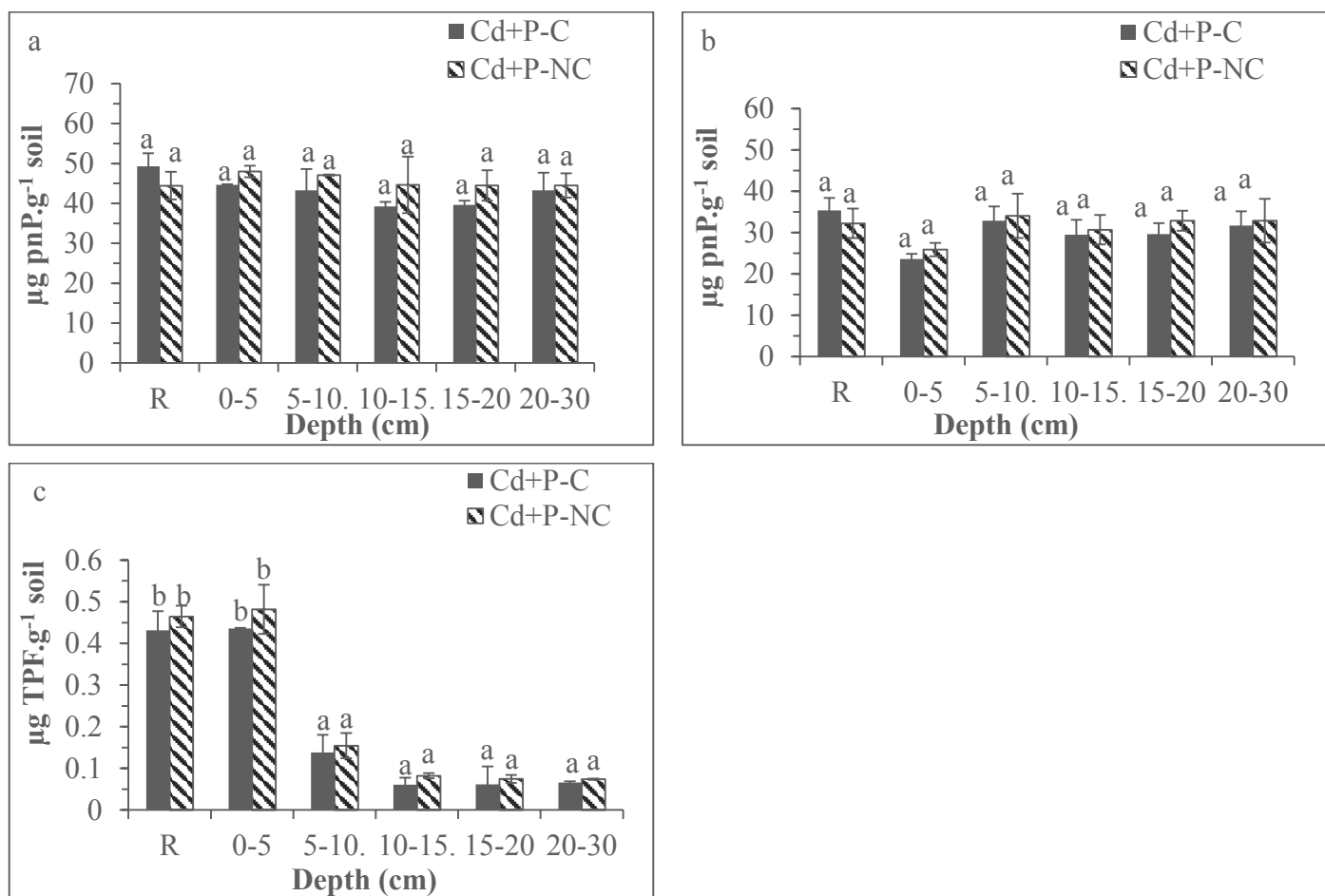


Fig. 8 Activities of a) Alkaline phosphatase, b) Acid phosphatase and Dehydrogenase in the rhizosphere and the different layers of Compacted and non-compacted soil amended with Cd and phosphate (Cd+P-C) and (Cd+P-NC).

Phosphate and cadmium together resulted in significantly similar values of the DHA activity in the rhizosphere and the top layer (0-5 cm) ($> 0.43 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ soil) initially, then it decreased when soil depth increased while maintaining the same values in all the layers ($< 0.15 \mu\text{g TPF.g}^{-1}$ soil) (Fig. 8c). Between the three enzymes studied, phosphate had the highest positive effect on DHA activity in both compacted and non-compacted soil whereas cadmium had the highest inhibiting action on the DHA activity in the compacted soil layers and on the ALP activity in

the non-compacted soil. Increasing soil bulk density has shown an insignificant but negative impact on the enzyme activities in all the treatments.

4. Conclusions

Microbial growth has been found to be deeply influenced by cadmium and combined phosphate-cadmium treatments. Moreover, increased soil density and depth lowered the microbial population growth. Cadmium showed harmful effects but not for CRB and PSM of non-compacted soil and for acid phosphatase in the two studied soil densities. In contrary, their activities were enhanced in presence of Cd. It was expected that clay abundance in soil increased cadmium adsorption and consequently lowered its toxicity. We think that Cd had conducted to a less alkaline soil and better performance of acid phosphatase activity. Phosphate fertilizer ameliorated microbial abundance but not the one of fungi and alkaline phosphatase production. Under combined phosphate-cadmium treatment, the expected positive effect of phosphorus was masked by the presence of Cd since only PSM and CRB were increased. In the case of cadmium contaminated alkaline soil, CRB can decrease the cadmium toxicity and PSM can be used as biofertilizer to promote P solubilization and induce its availability to plants. In fact, phosphorus abundance in soil increased roots growth, thus acid phosphatase.

References

- Aghababaei, F., Raiesi, F., Hosseinpour, A., 2014. The combined effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on microbial biomass and enzyme activities in a calcareous soil spiked with cadmium. *Appl. Soil Ecol.* 75, 33–42.
- Bolan, N. S., Adriano, D. C., Duraisamy, P., Mani, A., Arulmozhiselvan, K., 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. I. Effect of phosphate addition. *Plant Soil* 250, 83–94.
- Brennan, F. P., Moynihan, E., Griffiths, B. S., Hillier, S., Owen, J., Pendrowski, H., Avery, L. M., 2014. Clay mineral type effect on bacterial enteropathogen survival in soil. *Sci. Total Environ.* 468-469, 302–305.
- Buck, C., Langmaack, M., Schrader, S., 2000. Influence of mulch and soil compaction on earthworm cast properties. *Appl. Soil Ecol.* 14, 223–229.

- Canbolat, M. Y., Bilen, S., Cakmakci, R., Sahin, F., Aydin, A., 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol. Fertil. Soil* 42, 350–357.
- Castillo-michel, H. A., Hernandez, N., Martinez-martinez, A., Parsons, J. G., Peralta-vidua, J. R., Gardea-torresdey, J. L., 2009. Coordination and speciation of cadmium in corn seedlings and its effects on macro- and micronutrients uptake. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 608–614.
- Chen, Y. L., Palta, J., Clements, J., Buirchell, B., Siddique, K. H. M., Rengel, Z., 2014. Root architecture alteration of narrow-leafed lupin and wheat in response to soil compaction. *Field Crops Res.* 165, 61–70.
- Chu, H., Lin, X., Fujii, T., Morimoto, S., Yagi, K., Hu, J., Zhang, J., 2007. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2971–2976.
- Darwish, T. K., Faour, M., Masri, G., Shaaban, T., Bou Kheir, R., 2004. Land Degradation in Lebanon: Vulnerability of Soil Resources to Desertification. In United Nations/Islamic Republic of Iran Regional Workshop.
- De la Rosa, G., Peralta-vidua, J. R., Montes, M., Parsons, J. G., Cano-aguilera, I., Gardea-torresdey, J. L., 2004. Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere*, 55, 1159–1168.
- Dick, W. A., Cheng, L., Wang, P., 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1915–1919.
- Egamberdieva, D., Renella, G., Wirth, S., Islam, R., 2011. Enzyme activities in the rhizosphere of plants. In G. Shukla and A. Varma (Eds.), *Soil Enzymology* (pp. 149–166).
- Feng, Y., Grogan, P., Caporaso, J. G., Zhang, H., Lin, X., Knight, R., Chu, H., 2014. pH is a good predictor of the distribution of anoxygenic purple phototrophic bacteria in Arctic soils. *Soil Biol. Biochem.* 74, 193–200.

- François, M., Grant, C., Lambert, R., Sauvé, S. 2009. Prediction of cadmium and zinc concentration in wheat grain from soils affected by the application of phosphate fertilizers varying in Cd concentration. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 83, 125–133.
- Gadd, G. M., Griffiths, A. J., 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecol.* 4, 303–317.
- Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Zhang, C., Shi, W., 2010. Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. *J. Environ. Sci.* 22(7), 1040–1048.
- Garau, G., Castaldi, P., Santona, L., Deiana, P., Melis, P., 2007. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma*, 142, 47–57.
- Giuffré, L. G. de L., Miguez, S. R. De, Marban, L., 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Sci. Total Environ.* 204, 245–250.
- Grant, C. A., Bailey, L. D., 1997. Effects of Phosphorus and Zinc Fertiliser Management on Cadmium Accumulation in Flaxseed. *J. Sci. Food Agric.* 73, 307–314.
- Grant, C. A., Monreal, M. A., Irvine, R. B., Mohr, R. M., McLaren, D. L., Khakbazan, M., 2010. Preceding crop and phosphorus fertilization affect cadmium and zinc concentration of flaxseed under conventional and reduced tillage. *Plant Soil* 333, 337–350.
- Hajar, L., Haidar-Boustani, M., Khater, C., Cheddadi, R., 2010. Environmental changes in Lebanon during the Holocene: Man vs . climate impacts. *J. Arid Environ.* 74, 746–755.
- Hattori, H., 1992. Influence of heavy metals on soil microbial activities. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38(1), 93–100.
- Hinojosa, M. B., Carreira, J. A., Garcia-Ruiz, R., Dick, R. P., 2005. Microbial Response to Heavy Metal-Polluted Soils: Community Analysis from Phospholipid-Linked Fatty Acids and Ester-Linked Fatty Acids Extracts. *J. Environ. Qual.* 34, 1789–1800.
- Hong, C. O., Lee, D. K., Kim, P. J., 2008. Feasibility of phosphate fertilizer to immobilize cadmium in a field. *Chemosphere*, 70, 2009–2015.

- Hu, J., Lin, X., Wang, J., Chu, H., Yin, R., Zhang, J., 2009. Population size and specific potential of P-mineralizing and -solubilizing bacteria under long-term P-deficiency fertilization in a sandy loam soil. *Pedobiologia*, 53, 49–58.
- Ikeda, K., Toyota, K., Kimura, M., 1997. Effects of soil compaction on the microbial populations of melon and maize rhizosphere. *Plant Soil* 189, 91–96.
- Jeong, S., Moon, H. S., Nam, K., Kim, J. Y., Kim, T. S., 2012. Application of phosphate-solubilizing bacteria for enhancing bioavailability and phytoextraction of cadmium (Cd) from polluted soil. *Chemosphere*, 88, 204–210.
- Jiang, H. M., Yang, J. C., Zhang, J. F., 2007. Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress. *Environ. Pollut.* 147, 750–756.
- Jiao, W., Chen, W., Chang, A. C., Page, A. L., 2012. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environ. Pollut.* 168, 44–53.
- Jordan, D., Ponder, F., Hubbard, V. C., 2003. Effects of soil compaction, forest leaf litter and nitrogen fertilizer on two oak species and microbial activity. *Appl. Soil Ecol.* 23, 33–41.
- Jusoff, K., 1991. Effect of compaction of soils on growth of *Acacia mangium* Willd. under glasshouse conditions. *New Forests*, 5, 61–66.
- Karam, F., Mounzer, O., Sarkis, F., Lahoud, R., 2002. Yield and nitrogen recovery of lettuce under different irrigation regimes. *J. Appl. Hort.* 4(2), 70–76.
- Kelly, J. J., Haggblom, M. M., Tate, R. L., 2003. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. *Biol. Fertil. Soil* 38, 65–71.
- Köleli, N., Eker, S., Cakmak, I., 2004. Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil. *Environ. Pollut.* 131, 453–459.

- Kooistra, M. J., Schoonderbeek, D., Boone, F. R., Veen, B. W., Van Noordwijk, M., 1992. Root-soil contact of maize, as measured by a thin-section technique. II. Effects of soil compaction. *Plant Soil* 139, 119–129.
- Krämer, S., Green, D. M., 2000. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. *Soil Biol. Biochem.* 32, 179–188.
- Kucey, R. M. N., 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 63, 671–678.
- Kuperman, R. G., Carreiro, M. M., 1997. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem* 29(2), 179–190.
- Lambert, R., Grant, C., Sauvé, S., 2007. Cadmium and zinc in soil solution extracts following the application of phosphate fertilizers. *Sci. Total Environ.* 378, 293–305.
- Landi, L., Renella, G., Moreno, J. L., Falchini, L., Nannipieri, P., 2000. Influence of cadmium on the metabolic quotient, L- : D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biol. Fertil. Soil* 32, 8–16.
- Li, C. H., Ma, B. L., Zhang, T. Q., 2002. Soil bulk density effects on soil microbial populations and enzyme activities during the growth of maize (*Zea mays* L.) planted in large pots under field exposure. *Can. J. Soil Sci.* 147–154.
- Lima, J. A., Nahas, E., Gomes, A. C., 1996. Microbial populations and activities in sewage sludge and phosphate fertilizer-amended soil. *Appl. Soil Ecol.* 4, 75–82.
- Lorenz, N., Hintemann, T., Kramarewa, T., Katayama, A., Yasuta, T., Marschner, P., Kandeler, E., 2006. Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1430–1437.
- Mander, C., Wakelin, S., Young, S., Condon, L., O’Callaghan, M., 2012. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 44, 93–101.
- Monteiro, M. S., Santos, C., Soares, A. M. V. M., Mann, R. M., 2009. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotox. Environ. Safe* 72, 811–818.

- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., Valori, F., 2007. Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ci. Suelo (Argentina)*, 25(1), 89–97.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Fornasier, F., Moscatelli, M. C., Marinari, S., 2012. Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biol. Fertil. Soil* 48(7), 743–762.
- Nawaz, M. F., Bourrié, G., Trolard, F., 2013. Soil compaction impact and modelling. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 291–309.
- Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., Guimarães, C. T., Schaffert, R. E., Sá, N. M. H., 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1782–1787.
- Pan, J., Yu, L., 2011. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. *Ecol. Eng.* 37, 1889–1894.
- Pengthamkeerati, P., Motavalli, P. P., Kremer, R. J., 2011. Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. *Appl. Soil Ecol.* 48, 71–80.
- Pupin, B., Freddi, O. da S., Nahas, E., 2009. Microbial Alterations of the Soil Influenced by Induced Compaction. *R. Bras. Ci. Solo*, 33, 1207–1213.
- Renella, G., Mench, M., Lelie, D. Van Der, Pietramellara, G., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Nannipieri, P., 2004. Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 36, 443–451.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17, 319–339.
- Sardans, J., Pen, J., Ogaya, R., 2008. Experimental drought reduced acid and alkaline phosphatase activity and increased organic extractable P in soil in a *Quercus ilex* Mediterranean forest. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 509–520.

- Sardar, K., Qing, C., Abd El-latif, H., Yue, X., Ji-zheng, H., 2007. Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb. *J. Environ. Sci.* 19, 834–840.
- Schipper, L. A., Sparling, G. P., Fisk, L. M., Dodd, M. B., Power, I. L., Littler, R. A., 2011. Rates of accumulation of cadmium and uranium in a New Zealand hill farm soil as a result of long-term use of phosphate fertilizer. *Agric. Ecosyst. Environ.* 144, 95–101.
- Sharma, S., Kumar, V., Tripathi, R. B., 2011. Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 1(2), 90–95.
- Shestak, C. J., Busse, M. D., 2005. Compaction Alters Physical but Not Biological Indices of Soil Health. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 236–246.
- Son, J., Lee, Y., Kim, Y., Eun, L. S., Kim, J.-G., Hyun, S., Cho, K., 2011. Soil compaction as a stressor, and its effect on cadmium toxicity to *Paronychiurus kimi* (Collembola). *Appl. Soil Ecol.* 47, 204–209.
- Tan, X., Chang, S. X., Kabzems, R., 2008. Soil compaction and forest floor removal reduced microbial biomass and enzyme activities in a boreal aspen forest soil. *Biol. Fert. Soil* 44, 471–479.
- Urbanova, M., Snajdr, J., Baldrian, P., 2015. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biol. Biochem.* 84, 53–64.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fert. Soil* 30, 460–468.
- Velmourougane, K., Venugopalan, M. V., Bhattacharyya, T., Sarkar, D., Pal, D. K., Sahu, A., Ray, S. K., Nair, K. M., Prasad, J., Singh, R. S., 2013. Soil dehydrogenase activity in agro-ecological sub regions of black soil regions in India. *Geoderma*, 197-198, 186–192.
- Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N., Naidu, R., 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv. Environ. Res.* 8, 121–135.

- Wakelin, S., Mander, C., Gerard, E., Jansa, J., Erb, A., Young, S., Condron, L., O'Callaghan, M., 2012. Response of soil microbial communities to contrasted histories of phosphorus fertilisation in pastures. *Appl. Soil Ecol.* 61, 40–48.
- Wang, Y., Shi, J., Wang, H., Lin, Q., Chen, X., Chen, Y., 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotox. Environ. Safe* 67, 75–81.
- Wenzel, W. W., Lombi, E., Adriano, D. C., 1999. Biogeochemical processes in the rhizosphere: Role in phytoremediation of metal-polluted soils. In *Heavy metal Stress in plants* (pp. 273–303).
- Yuan, B. C., Yue, D.-X. 2012. Soil microbial and enzymatic activities across a chronosequence of chinese pine plantation development on the loess plateau of China. *Pedosphere*, 22(1), 1–12.
- Zhao, B., Chen, J., Zhang, J., Qin, S., 2010. Soil microbial biomass and activity response to repeated drying-rewetting cycles along a soil fertility gradient modified by long-term fertilization management practices. *Geoderma*, 160, 218–224.
- Zhi-xin, Y., Shu-qing, L., Da-wei, Z., Sheng-dong, F., 2006. Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *J. Environ. Sci.* 18(6), 1135–1141.
- Zorrig, W., Rouached, A., Shahzad, Z., Abdelly, C., Davidian, J.-C., Berthomieu, P., 2010. Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *J. Plant Physiol.* 167, 1239–1247.

Suite à l'étude dans la partie C de l'influence du cadmium sur les propriétés des laitues dans un sol alcalin typique de différentes densités et traités par des engrais phosphatés, trois questions ont été relevées:

- En absence d'un milieu alcalin de haute dynamique d'adsorption, quelle(s) influences peut exercer le cadmium sur les propriétés des laitues?
- Est-ce que les phosphates en solution peuvent inhiber l'absorption du cadmium par les laitues?
- Est-ce que la culture hydroponique est plus risquée que la culture traditionnelle dans le sol pour les laitues quand on a un milieu contaminé en cadmium?

Dans ce contexte, la partie E de ce chapitre vient pour répondre à ce genre des questions.

Partie D

EFFECT OF CADMIUM ON *LACTUCA SATIVA* GROWN IN HYDROPONIC CULTURE ENRICHED WITH PHOSPHATE FERTILIZER

Résumé

Le cadmium (Cd), un des métaux lourds les plus toxiques ajouté au sol après la fertilisation phosphatée, a été étudié. Les effets de ce métal sur les modifications morphologiques et physiologiques de *Lactuca sativa* et sa répartition dans les différentes parties de cette plante ont été évalués. En parallèle, *Lactuca sativa* a été cultivée en condition hydroponique en modifiant la solution nutritive Hoagland. Cette solution a été soumise à cinq concentrations de Cd, 0; 0,093; 0,186; 0,279 et 0,372 mg Cd/L et trois concentrations de P, 0; 123.34 et 585 mg P/L. L'étude a montré un effet positif du phosphore sur l'allongement racinaire et la surface foliaire, tandis que le cadmium a inhibé la croissance des plantes et parfois a provoqué la mort des laitues. Le cadmium a été accumulé dans les racines et le zinc était accumulé dans les feuilles et les tiges. L'augmentation de la performance de *Lactuca sativa* en culture hydroponique et dans la solution Hoagland contaminée en cadmium était plus importante que celles cultivées dans un sol contaminé en Cd et amendé ou non avec du phosphore.

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

Abstract¹

Cadmium (Cd), one of the most toxic heavy metal added to soil after phosphate fertilizer treatment, was investigated. The effects of this metal on morphological and physiological changes of *Lactuca sativa* were studied in addition to its partitioning in different parts of the crop. In parallel, *Lactuca sativa* were allowed to grow under hydroponic conditions with modifications of the Hoagland nutrient solution. This solution was submitted to five Cd concentrations, 0, 0.093, 0.186, 0.279 and 0.372 mg Cd/L and three P concentrations, 0, 123.34 and 585 mg P₂O₅/L. The study showed a positive effect of phosphorus on root elongation, surface area while cadmium inhibited plant growth and sometimes the death of the plants. Cadmium was found to be accumulated in roots while zinc is preferably accumulated in the leaves and stems. The increase of performance of *Lactuca sativa* under hydroponic condition and Hoagland contaminated solution with cadmium was found to be better than the ones grown in Cd amended soil with or without phosphorus.

1. Introduction

Cadmium (Cd) naturally occurs at trace levels in the environment but tends to accumulate abundantly in soils. Accumulation is due to agricultural practices such as the application of phosphate fertilizers, use of wastewater for irrigation, and application of biosolids and composts from urban wastes [1]-[3]. It is considered as a potentially phytotoxic element due to its high toxicity and solubility in water [4]. Most general symptoms of Cd toxicity in plants are stunted growth, chlorosis, necrotic lesions, wilting and disturbances in mineral nutrition and carbohydrate metabolism. It strongly reduces biomass production and even conducts to integral plant death [4]-[6]. Cadmium has been shown to interfere with uptake, transport, and use of several nutrient elements and water by plants. It can suppress iron uptake by plants, induces P deficiency and reduces manganese transport to the plant [6]-[8]. It is readily absorbed by plant roots which are at the base of the food chain where it becomes very toxic to both plants and animals [9] [10].

Among cultivated plant species, *Lactuca sativa* (lettuce) is a worldwide important crop and one of the most consumed leafy vegetables in the human dietary [6] [11]. It is rich mainly in vitamins A and C and minerals such as iron and phosphorus [12]. In 2010, the world production of lettuce was approximately 24 million metric tons, with a cultivation area of 1 million hectares [13] [14]. This crop is known for its comparatively high accumulation of cadmium in leaves [9]. In this perspective, *Lactuca sativa* specie has been designated for studying the impact of diets based on food crops cultivated on cadmium contaminated soils on human health [9]. It was chosen as a monitoring tool for the evaluation of the environmental contamination of Ni and Cd especially that EPA and the Organization for Economic Cooperation and Development have recommended this crop a key specie [14].

Nevertheless, since most of this crop is usually grown in greenhouses, with the application of special substrates and fertilization practices including water reuse, it was associated with the risk of increasing heavy metals concentration [6] [8]. Studies aiming to improve and understand cadmium toxicity in plant metabolism have been done on hydroponic cultures due to their easiness and suitability [15]. Hydroponic culture was used also to evaluate phytoextraction of cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard [16].

Hydroponics have several advantages including the possibility of using areas unsuitable for conventional farming, such as arid and degraded soils, independence of the crop to weather

conditions leading to its cultivation all over the year [17], and reduction in the use of labor-intensive activities such as weeding and soil preparation. This technique allowed a reduction in the plant cycle (45-60 days), leading to an anticipated harvest; moreover, it enabled an active crop rotation, improved financial returns, and an efficient use of cultivation resources specially water and nutrients, while maintaining great environmental benefit.

Hydroponic systems weren't only associated to an increase in production yields, but also to a reduction in the overall production costs by enabling better control and standardization of the production process [13] [17]. In hydroponic crops, absorption is usually proportional to the concentration of nutrients in the solution near the roots influenced by the salinity, oxygenation, temperature and pH of the nutrient solution [13]. In soil, cadmium uptake is conditioned by its concentration in the soil and its bioavailability influenced by the presence of organic matter and clay, pH, redox potential, temperature and concentrations of other elements [6].

In this context, lettuce has been selected due to several special features that aren't restricted to its high accumulation of cadmium in leaves, but also involving its capability of growing easily in hydroponic systems, that permit the control of the tissue metal concentration [18]. Studies emphasized on the impact of cadmium on the growth of lettuce plants, as well as on the absorption process of cadmium at the level of the roots, in addition to the distribution of cadmium through different organs [9].

To grow, plants, in soil or in hydroponic culture, need micronutrients and macronutrients. In the hydroponic culture, these nutrients were found in the Hoagland solution which was developed by D.R. Hoagland and D.I. Arnon in 1933 and is appropriate for the growth of large variety of plant species.

In order to understand the fundamental processes happening during the experiments, morphological and physiological characteristics, cadmium distribution in different parts of *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture were investigated under five Cd concentrations, 0, 0.093, 0.186, 0.279 and 0.372 mg Cd/L and three P concentrations, 0, 299 and 1420 mg P/L.

2. Experimental Section

2.1. Hydroponic support cylinders

Forty-five bins of 1150 mL volume each framed with black film were used for lettuces growth to prevent algal growth. 90 identical disks from rigid Styrofoam sheets were cut and

measured to fit into the opening of the bins; 45 disks were made from 1 cm thick sheets and 45 from 2 cm. All disks were then perforated in two areas; one 2 cm hole in the middle of the disks and a 0.5 cm hole on a random area of the disk. Straws were pushed through this second hole and reach the bottom of the bin to aerate the system. Every 1 cm thick disk was then glued to a 2 cm thick disk, with an inert 5 mm net in between them, using regular white adhesive. The inert film acted as the support system for the lettuce plants, through which the roots of the plants pass to reach the nutrient solution underneath. Finally the bins were randomly placed in a greenhouse of controlled temperature between 20°C and 23°C as the ideal temperature for lettuce development is 23°C [12], exposed to sunlight and artificially lit with numerous fluorescent lamps 24 hours a day, every day.

2.2 Lactuca sativa plants and growth conditions

Forty five lettuce plants were grown on peat for 15 days; they were afterwards removed and rinsed by tap water to remove all remaining peat particles off the roots. The fifteen-day-old plantlets were then transferred to hydroponic conditions, with 45 plantlets grown in 1150 mL of aerated nutrient solution. The nutrient solution or Hoagland solution contained 60.662 mg/L KNO₃, 94.4 mg/L Ca(NO₃)₂, 49.2 mg/L MgSO₄, 2.86x10³ mg/L H₃BO₃, 1.18x10³ mg/L MnCl₂.4H₂O, 0.22x10³ mg/L ZnSO₄.7H₂O, 0.08x10³ mg/L CuSO₄.5H₂O, 0.02x10³ mg/L H₂MoO₄.H₂O, 2.61x10⁻³ mg/L EDTA, 1.9x10⁻³ mg/L KOH and 2.49x10⁻³ mg/L FeSO₄.7H₂O at pH 6.

To study the effect of cadmium and phosphorus on the plant morphology, accumulation and transfer of cadmium into the lettuces, different concentrations of cadmium prepared from CdCl₂.H₂O (99.99%; Sigma-Aldrich) and phosphorus prepared from simple superphosphate fertilizer (18% P₂O₅ were added to the nutrient solution to complete the volume of bins to 1.15 L as showed in **Table 1**. Each treatment was triplicated. Metals identified in superphosphate fertilizer were very low; Pb, Cd, Zn and Cu were respectively 10 ± 0.2; 5.1 ± 0.8; 92.26 ± 12 and 6 ± 0.5 mg/Kg of fertilizer which are very low contents considering the fertilizer added quantity

The Hoagland solution without P and Cd were used as control samples. Nutrient solutions were changed twice a week over the course of the entire experiment.

At the eighth week, the lettuces were harvested. Leafs numbers were counted, plants height, roots length, shoots and roots fresh mass (FW_S and FW_R respectively) and fresh leaves surface

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

areas were measured. After these measurements, roots, stems and leaves were dried at 80°C for 48 hours in ventilated oven, and then dry mass of each part was determined (DW_R , DW_S and DW_L for roots, stems and leaves dry weight respectively). Dry weight of the areal part (DWA_P) was also measured.

The dried samples were homogenized by grinding using a stainless steel blender. A sample mass between 50 and 1000 mg of each plant parts were digested in 20 mL HNO_3 (14 M, Merck). Finally, cadmium in the leaves, stems and roots of lettuces were analyzed using furnace atomic absorption spectrophotometer (AAS) (Rayleigh WFX-210 AA spectrophotometer).

Table 1 Hydroponic treatments.

Treatments	Element concentrations	
	P_2O_5 (mg/L)	Cd (mg/L)
P0Cd0	P0 = 0	Cd0 = 0
P0Cd1		Cd1 = 0.093
P0Cd2		Cd2 = 0.186
P0Cd3		Cd3 = 0.279
P0Cd4		Cd4 = 0.372
P1Cd0	P1 = 123.34	Cd0 = 0
P1Cd1		Cd1 = 0.093
P1Cd2		Cd2 = 0.186
P1Cd3		Cd3 = 0.279
P1Cd4		Cd4 = 0.372
P2Cd0	P2 = 585	Cd0 = 0
P2Cd1		Cd1 = 0.093
P2Cd2		Cd2 = 0.186
P2Cd3		Cd3 = 0.279
P2Cd4		Cd4 = 0.372

All the data reported represent an average of three replicates with standard deviation. XLSTAT software (Version 2014.5.03) was used to treat the data. One-way ANOVA was used to detect treatment effects, Duncan's test was used to determine significant differences between treatment means and Principal Component Analysis (PCA), Pearson (n-1) type was used to detect the correlations between the parameters. All statistical tests are used with an acceptable error margin of 5%.

3. Results and Discussion

3.1. Aerial part of *Lactuca sativa* grown under Cadmium treatments

In order to analyze the effects of cadmium on lettuce growth, plants length and number of leaves were determined during the 8 weeks of culture in the hydroponic systems. Plants submitted to high cadmium concentration or none P concentration were dead and some of its exhibited symptoms of necrosis (**Figure 1**).

Lettuces lengths increased by 45% between treatments without P and Cd (P0Cd0) and treatments with P and without Cd (P1Cd0, P2Cd0). This increase was only observed in treatments without Cd where the plants lengths decreased with increasing Cd concentrations (**Table 2**). Cadmium displayed a negative effect on lettuces growth where cadmium inside plant tissues can inhibit the photosynthesis by inhibiting chlorophyll and photosystem II together responsible of the photochemical efficiency of the plants [9] [11].

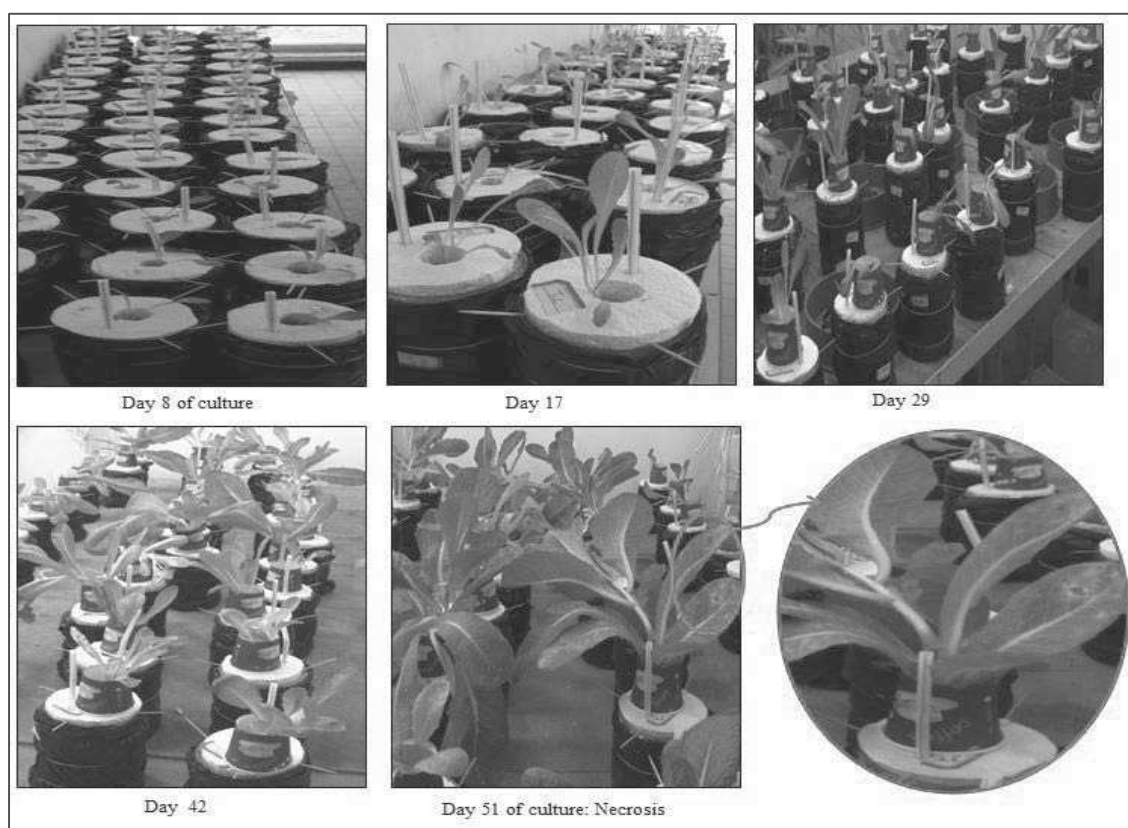


Figure 1 Evolution of the aerial part of *Lactuca sativa*.

Leaves number and surface area decreased in all the treatments in a non-significant way with cadmium increase except in the treatments where P is at its highest concentration in the nutrient

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

solution (P2) (**Table 2**). Increased leaves number and surface area were observed when P concentration was increased. For example, leaves number reached an augmentation of 45% between P1Cd1 and P2Cd1, the surface area increased by 78 and 88% between P0-P1 and P0-P2 respectively and the lowest leaves number and surface area occurred in P0 due to the stress effect of the lettuces resulted from the absence of an important macro element (**Table 2**). At high cadmium level (Cd2 to Cd4), this metal had decreased lettuces productivity but at lower level (P0Cd0 and P0Cd1) where cadmium had stimulated productivity. For the leaves surface area, the phosphorus level played an important role. At low P concentration and in increasing Cd levels in the nutrient solution, leaf area decreased by 54, 61 and 73% when comparing P1Cd2, P1Cd3 and P1Cd4 to P1Cd0 respectively. At higher P treatment (P2), a significant decrease by 73% of surface area was observed between P2Cd0 or P2Cd1 and P2Cd2, P2Cd3 and P2Cd4. Therefore, the positive effect of phosphorus and the negative effect of Cd were both observed on the leaves number and the surface area in the treatments. The same negative effect of cadmium on the leaves surface area was shown on peas cultivated for 15 days with a 2.7-fold reduction in dry weight and surface area in comparison with peas cultivated without cadmium [5].

Table 2 Lettuces length leaves number and surface area of lettuces under different treatments.

Treatments		Parameters		
		Length (cm)	Leaves number	Surface area (cm ²)
Phosphate	Cadmium			
P0	Cd0	22 ± 3.8 ^{ab}	9 ^{ab}	116 ± 42.2 ^a
	Cd1	23 ± 4.4 ^{ab}	9 ± 0.9 ^{ab}	103 ± 1.9 ^a
	Cd2	22 ± 2.3 ^{ab}	10 ± 0.5 ^{ab}	109 ± 14.3 ^a
	Cd3	24 ± 0.2 ^{abc}	9 ± 0.5 ^{ab}	48 ± 5 ^a
	Cd4	20 ± 1.5 ^a	8 ^a	57 ± 8.1 ^a
P1	Cd0	40 ± 5.1 ^e	13 ± 2.2 ^b	532 ± 99.4 ^c
	Cd1	36 ± 3.4 ^{de}	11 ± 1 ^{ab}	412 ± 98.2 ^{bc}
	Cd2	30 ± 5.5 ^{bcd}	11 ± 1 ^{ab}	244 ± 113.7 ^{ab}
	Cd3	33 ± 0.1 ^{cde}	12 ± 0.5 ^{ab}	204 ± 41 ^{ab}
	Cd4	27 ± 1.2 ^{abc}	9 ± 0.5 ^{ab}	145 ± 17.4 ^a
P2	Cd0	40 ± 0.1 ^e	20 ± 2.5 ^c	986 ± 131.7 ^d
	Cd1	30 ± 3.1 ^{bcd}	20 ± 3.5 ^c	976 ± 152.2 ^d
	Cd2	28 ± 0.2 ^{abcd}	13 ± 1.5 ^{ab}	303 ± 2.5 ^{abc}
	Cd3	26 ± 1.2 ^{abc}	12 ± 1.5 ^{ab}	227 ± 61.5 ^{ab}

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

Cd4	28 ± 1.1 ^{abcd}	12 ± 1.5 ^{ab}	230 ± 29.2 ^{ab}
-----	------------------------------	----------------------------	------------------------------

Means within columns followed by the same letters do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$).

Fresh weights of stem (FW_S) and leaves (FW_L) were related to the number of leaves and the surface area (**Table 3**). Moreover, fresh weights of these aerial parts had a similar trend as leaves number and surface area in absence of phosphorus. They decreased in a non-significant way when increasing the cadmium level from 0 to 0.372 mg/L (Cd0 to Cd4) due to the stress in absence of phosphorus. Phosphorus enhanced FW_S and FW_L but these weights decreased in two ways when cadmium increased. FW_S increased by 72 and 82% between P0-P1 and P0-P2 respectively and FW_L increased by 82 and 92% in the same treatments without cadmium. A decrease by 30 and 18% was observed in FW_S and FW_L respectively when Cd level was 0.093 mg/L and reached its highest level (82%) at Cd content equal to 0.372 mg/L (**Figure 2**).

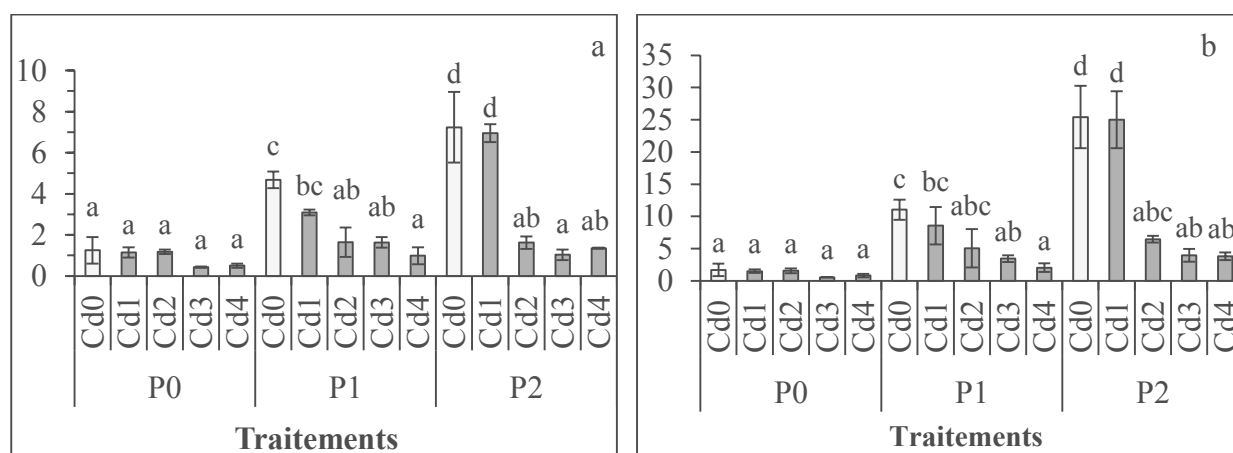


Figure 2 Fresh weight in (g) of a) Stems and b) Leaves of lettuces as function of P and Cd.

Cadmium has been shown to interfere with the uptake and the transport of several elements since Cd^{2+} absorption occurs via the same transmembrane carriers used to uptake Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} et Mg^{2+} leading to a disturbing of the growth of lettuces and decreasing in fresh weights [6] [7]. The weak decreases in FW_S and FW_L can be explained by the stimulatory effects of small amount of Cd. The Cd stimulation on plant growth was observed in hydroponic experiments with rice, soybean and sorghum and is related to the disruption in the homeostasis of the plants [10].

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

Table 3 Matrix of Pearson correlation (n-1) for physiological and morphological parameters of the lettuces aerial part.

Variables	Leaves number	Surface area	FW _L	FW _S	DW _S	DW _L	DW _{AP}
Leaves number	1						
Surface area	0.9502	1					
FW _L	0.8773	0.9561	1				
FW _S	0.9063	0.9607	0.9490	1			
DW _S	0.9150	0.9268	0.8863	0.9252	1		
DW _L	0.9147	0.9530	0.8822	0.9094	0.8840	1	
DW _{AP}	0.9184	0.9634	0.9334	0.9332	0.9046	0.9757	1

In addition to the cadmium inhibition effects on the FW_S and FW_L, stems dry weight (DW_S) and leaves dry weight (DW_L) exposed to medium concentrations of Cd had a similar behavior as FW_S and FW_L due to the interference of Cd with the nutrients. In fact, when phosphorus was increased from P0 to P1 to P2, DW_S and DW_L increased together but they decreased in a non-significant way when Cd was added. The increase of dry weights was less than the fresh weight for the stems and leaves. It reached 50 and 67% for DW_S, 73 and 81% for DW_L in P1Cd0 and P2Cd0 compared to P0Cd0 respectively (**Table 4**). However, in a previous study, DW_L decrease with cadmium concentration was also observed in *Brassica juncea* in hydroponic culture when cadmium was applied between 9 and 30 mg/L [10].

Table 4 Dry weights of stems and leaves and fresh weight of the aerial parts of the lettuces in the different treatments.

Treatments		Parameters			
		DW _S (g)	DW _L (g)	DW _{AP} (g)	
Phosphate	Cadmium				
		Cd0	0.142 ± 0.08 ^a	0.51 ± 0.07 ^a	0.647 ± 0.16 ^{ab}
		Cd1	0.164 ± 0.05 ^{ab}	0.46 ± 0.07 ^a	0.509 ± 0.1 ^{ab}
		Cd2	0.075 ± 0.003 ^a	0.53 ± 0.1 ^a	0.695 ± 0.15 ^{ab}
		Cd3	0.063 ± 0.01 ^a	0.43 ± 0.03 ^a	0.374 ± 0.14 ^a
	Cd4	0.027 ± 0.01 ^a	0.42 ± 0.03 ^a	0.419 ± 0.1 ^a	
P1	Cd0	0.286 ± 0.01 ^b	1.39 ± 0.13 ^b	1.528 ± 0.24 ^c	
	Cd1	0.137 ± 0.05 ^a	1 ± 0.04 ^{ab}	1.135 ± 0.09 ^{bc}	
	Cd2	0.096 ± 0.03 ^a	0.68 ± 0.03 ^a	0.789 ± 0.05 ^{ab}	
	Cd3	0.092 ± 0.01 ^a	0.64 ± 0.04 ^a	0.743 ± 0.03 ^{ab}	
	Cd4	0.078 ± 0.03 ^a	0.55 ± 0.08 ^a	0.648 ± 0.12 ^{ab}	
P2	Cd0	0.426 ± 0.12 ^c	2.77 ± 0.2 ^c	3.192 ± 0.08 ^d	
	Cd1	0.469 ± 0.08 ^c	2.67 ± 0.73 ^c	3.161 ± 0.66 ^d	

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

Cd2	0.172 ± 0.01 ^{ab}	0.81 ± 0.14 ^{ab}	1.112 ± 0.07 ^{bc}
Cd3	0.104 ± 0.03 ^a	0.73 ± 0.09 ^{ab}	0.764 ± 0.05 ^{ab}
Cd4	0.096 ± 0.02 ^a	0.7 ± 0.2 ^a	0.793 ± 0.21 ^{ab}

Means within columns followed by the same letters do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

The dry weight of the aerial part of lettuces $DW_{A,P}$ was positively correlated to fresh and dry weight of stems and leaves (**Table 3**). $DW_{A,P}$ increased by 58 and 52% when P level was 686 and 3250 mg/L compared to the treatment in absence of phosphorus and cadmium. A decrease by 48 and 65% occurs between the two couples P1Cd0/P1Cd2 and P2Cd0/P2Cd2 respectively. However, for cadmium concentrations beyond 0.186 mg/L and in presence of phosphorus, DW_{AP} values were stable while no effect of P or Cd was identified, revealing the formation of Cd-P complex that inhibited cadmium effect.

3.2. Root part of *Lactuca sativa* grown under Cadmium treatments

Root length of lettuces in treatments P0 didn't show any changes when cadmium was added. The presence of 100 μ M Cd didn't affect root length of lettuces after 7 days of culture in Hoagland's medium enriched with $Cd(NO_3)_2$ [11]. When phosphorus was added at 686 mg/L level, root length was inhibited only when cadmium was at its highest level (0.372 mg/L) and this behavior was not observed when P2 was applied enhancing the hypothesis of Cd-P complex formation in roots that inhibits cadmium absorption [4] (**Table 5**). Although in non-significant way, root length was increased when P was added as it is a limiting factor for plant and root growth. The reduction in root growth is due to low P-induced that inhibits cell division in the root meristem and changes of the root system architecture [19].

Unlike the root length, the fresh weight of roots (FW_R) decreased when phosphorus was absent and when cadmium was increased in the nutrient solution. FW_R increased when phosphorus increased. It increased by 67 and 80% in P1 and P2 respectively compared to P0. Under the same phosphorus concentration, FW_R decreased by an average of 64% in P1Cd4 and P2Cd2 compared to P1Cd0 and P2Cd0 respectively. At high P level (P2), FW_R wasn't affected by Cd when its concentration was above 0.186 mg/L (**Table 5**).

The same behavior was observed for the dry weight of the roots (DW_R) with an exception of a 70% reduction in DW_R when lettuces were grown in treatment without phosphorus and under high concentration levels of cadmium (Cd3 and Cd4). Root length, FW_R and DW_R were found positively correlated but in moderate way (0.4-0.6). Thus it can be due to an increase of the

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

density of the lateral roots and reduction of the primary root length in response to low P availability and cadmium presence. Previous studies reported that low P level induce the increase of lateral root number and density over primary root growth [19] [20].

Table 5 Root length, fresh and dry weights of roots of the lettuces.

Treatments		Parameters		
		Root length (cm)	FW _R (g)	DW _R (g)
Phosphate	Cadmium			
P0	Cd0	16 ± 4.1 ^{abcd}	1.34 ± 0.5 ^{abcd}	0.156 ± 0.0045 ^{bc}
	Cd1	17 ± 0.4 ^{abcd}	1.3 ± 0.3 ^{abc}	0.157 ± 0.0029 ^{bc}
	Cd2	14 ± 1.2 ^{abcd}	1.2 ± 0.4 ^{abc}	0.159 ± 0.0087 ^{bc}
	Cd3	14 ± 2.5 ^{abc}	0.38 ± 0.08 ^a	0.048 ± 0.0079 ^a
	Cd4	13 ± 0.6 ^{ab}	0.63 ± 0.2 ^a	0.052 ± 0.0136 ^a
P1	Cd0	18 ± 0.9 ^{cd}	2.72 ± 0.3 ^d	0.136 ± 0.0165 ^{ab}
	Cd1	18 ± 0.8 ^{cd}	2.56 ± 0.5 ^{cd}	0.134 ± 0.0187 ^{ab}
	Cd2	16 ± 1.4 ^{cbcd}	1.54 ± 0.1 ^{abcd}	0.088 ± 0.0048 ^{ab}
	Cd3	15 ± 0.4 ^{abcd}	1.23 ± 0.1 ^{abc}	0.081 ± 0.0014 ^{ab}
	Cd4	13 ± 2.5 ^a	1.04 ± 0.3 ^{ab}	0.063 ± 0.0188 ^{ab}
P2	Cd0	18 ± 0.6 ^{bcd}	5.14 ± 1 ^e	0.246 ± 0.0656 ^{cd}
	Cd1	19 ± 0.6 ^d	5.3 ± 0.7 ^e	0.303 ± 0.0784 ^d
	Cd2	17 ± 0.7 ^{abcd}	2.25 ± 0.6 ^{bcd}	0.1 ± 0.0055 ^{ab}
	Cd3	17 ± 1 ^{abcd}	1.71 ± 0.2 ^{abcd}	0.107 ± 0.009 ^{ab}
	Cd4	17 ± 0.2 ^{abcd}	1.29 ± 0.26 ^{abc}	0.097 ± 0.0297 ^{ab}

Means within columns followed by the same letters do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$)

3.3. Cadmium transfer to *Lactuca sativa*

Most of the cadmium was accumulated in lettuces roots when the concentration of this heavy metal was greater than 0.186 mg/L and in absence of phosphorus. When phosphorus level and cadmium was increased together in the nutrient solution till 299 mg P/L (P1) and 0.093 mg Cd /L, cadmium level found in the roots was increased and the one in the aerial part was diminished (**Figure 3**). Cadmium in aerial part and roots was increased in the treatment P2Cd0 compared to P0Cd0.

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

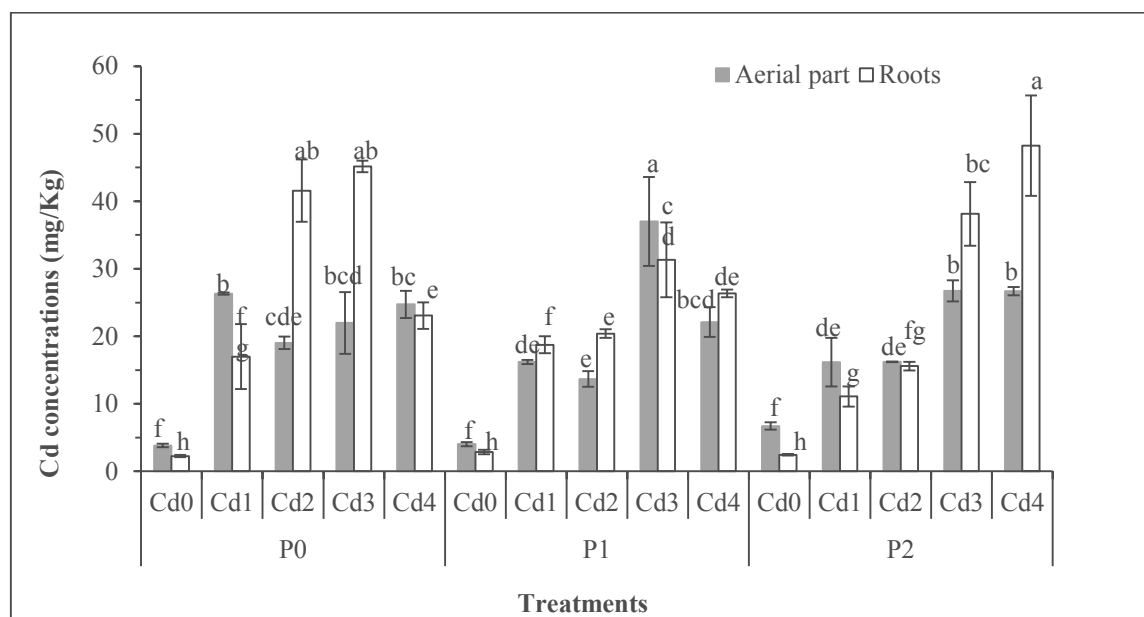


Figure 3 Cadmium levels in aerial and root parts of lettuces in all treatments.

In fact, phosphorus had a role in developing the root system. Hence it is not surprising to find that cadmium absorption is more important in presence of phosphorus than in its absence, but the absorption varies with the cadmium availability to plants. The quantity transferred to the stems and leaves was almost the same in all the treatments. Accordingly, the partition of the cadmium in different lettuces parts could be a useful strategy to avoid toxicity in aerial parts. Iron found in lettuces roots was more abundant than in aerial parts. Its absorption decreased when phosphorus was added no matter the cadmium concentration present in the nutrient solution. However, Zinc had a different behavior. Zn was accumulated in the leaves then in roots and the smallest amount of zinc was found in the stems (**Table 6**).

Table 6 Iron and Zinc concentrations in different parts of the lettuces.

Phosphate levels	Elements				
	Fe (mg/g)		Zn (mg/g)		
	Aerial parts	Roots	Leaves	Stems	Roots
P0	299.8 ± 52	3364 ± 231	592 ± 39	23 ± 9	38 ± 1.5
P1	70.4 ± 7	1606 ± 185	478 ± 42	16 ± 2	53 ± 5.6
P2	49.5 ± 7.5	950 ± 147	435 ± 56	19 ± 1.1	66 ± 4

It is known in the literature than cadmium absorption is influenced by the presence of zinc since they belong to the same group in the periodic table and have a similar nuclear structure

and ionic radius [21] [22]. In this study, Zn was found inversely proportional to Cd and in the tissues where cadmium was present in large quantities, Zn was very low and vice-versa, thus a competition between those elements [21] [23] [24]. In fact, an antagonistic interaction for Cd and Zn uptake and translocations by plants was demonstrated by several authors [25] [26].

4. Conclusion

Phosphate fertilizer was found to increase leaves number, surface area, root elongation and fresh and dry weight of stems and leaves. Phosphorus had an important role in developing the root system. However, cadmium induced opposite effects on the plants when present in the nutrient solution; it conducted the death and the necrosis of some lettuces plants. On the other hand, cadmium had decreased fresh and dry weights of stems and leaves, root length and fresh and dry weight of roots. In highly cadmium contaminated nutrient solution, roots of *Lactuca sativa* absorbed the cadmium that is transferred to the aerial lettuces parts. Absorption of Cd was influenced by the presence of Zn in the nutrient solution that is accumulated in the stems and leaves of the plants while Fe and Cd were accumulated in the roots. With increasing Cd concentration in the Hoagland solution and at high P level, the absorption and transfer of cadmium increased for both in the roots and the aerial parts.

Despite the easiness and rapidity of crop growth in hydroponic culture, this system may become a potential source of bioavailable cadmium that is absorbed by lettuces and transferred to roots and aerial parts conducting at least to deep morphological changes. The sufficient presence of phosphorus in nutrient media may inhibit cadmium or and iron absorption by the plants. Therefore, a particular attention must be done when Cd enriched phosphate fertilizers are used in hydroponic culture cycles.

References

- [1] Belon, E., Boisson, M., Deportes, I.Z., Eglin, T.K., Feix, I., Bispo, A.O., Galsomies, I., Leblond, S., Guellier, C.R. (2012) An inventory of trace elements inputs to French agricultural soils. *Science of The Total Environment*, **439**, 87-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.011>
- [2] Thakur, S.K., Tomar, N.K., Pandeya, S.B. (2006) Influence of phosphate on cadmium sorption by calcium carbonate. *Geoderma*, 130, 240-249. [doi:10.1016/j.geoderma.2005.01.026](http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.01.026)

- [3] Kirkham M.B. (2006) Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, **137**, 19-32. [doi:10.1016/j.geoderma.2006.08.024](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024)
- [4] Dheri, G.S., Brar, M.S., Malhi, S.S. (2007) Influence of phosphorus application on growth and cadmium uptake of spinach in two cadmium-contaminated soils. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*, **170**, 495-499. <http://dx.doi.org/10.1002/jpln.200625051>
- [5] Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., Sandalio, L.M. (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂ .- and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell & Environment*, **27**, 1122-1134. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x>
- [6] Dias, M.C, Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., Santos, C. (2012) Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**, 1281-1289. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-012-11678-8>
- [7] Das, P, Samantaray, S, Rout, GR. (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution*, **98** (1), 29-36. [doi:10.1016/S0269-7491\(97\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00110-3)
- [8] Lopez-Millan, A-F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A., Abadía, J. (2009) Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany*, **65**, 376-385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.11.010>
- [9] Zorrig, W., Rouached, A., Shahzad, Z, Abdelly, C, Davidian, J-C, Berthomieu, P. (2010) Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 1239-1247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.012>
- [10] Armas, T., Pinto, A.P., de Varennes, A., Mourato, M.P., Martins, L.L., Gonçalves Simões, L.L., Mota, A.M. (2015) Comparison of cadmium-induced oxidative stress in Brassica juncea in soil and hydroponic cultures. *Plant and Soil*, **388** (1-2), 297-305. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-014-2330-3>

- [11] Monteiro, M.S., Santos, C., Soares, A.M.V.M., Mann, R.M. (2009) Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 811-818. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.08.002>
- [12] Feltrim, A.L., Filho, A.B.C., Branco, R.B.F., Barbose, J.C., Salatiel, L.T. (2005) Yield of american lettuce cultivated in soil and hydropony during winter and summer seasons, in Jaboticabal, SP. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **9** (4), 505-509. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662005000400010>
- [13] Domingues, D.S., Takahashi, H.W., Camara, C.A.P., Nixdorf, S.L. (2012) Automated system developed to control pH and concentration of nutrient solution evaluated in hydroponic lettuce production. *Computers and Electronics in Agriculture*, **84**, 53-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2012.02.006>
- [14] Liu, Y., Vijer, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M. (2014) Impacts of major cations (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) and protons on toxicity predictions of nickel and cadmium to lettuce (*Lactuca sativa* L.) using exposure models. *Ecotoxicology*, **23**, 385-395. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-014-1202-1>
- [15] Astolfi, S., Zuchi, S., Passera, C. (2004) Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil or hydroponic culture. *Biologia Plantarum*, **48** (3), 413-418. <http://dx.doi.org/10.1023/B:BIOP.000041095.50979.b0>
- [16] Zhi-xin, N., Li-na, S., Tie-heng, S., Yu-shuang, L., Hong, W. (2007) Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences*, **19**, 961-967. [doi:10.1016/S1001-0742\(07\)60158-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60158-2)
- [17] Costa, E. and Leal P.A.M. (2009) Produção de alface hidropônica em três ambientes de cultivo. *Engenharia Agrícola, Jaboticaba*, **29** (3), 358-369. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162009000300003>
- [18] Waisberg, M., Black, W.D., Waisberg, C.M., Hale, B. (2004) The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce

(*Lactuca sativa* L. cv. Ostinata). *Food Chemical and Toxicology*, **42**, 835-842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2004.01.007>

[19] Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Gutiérrez-Ortega, A., Hernández-Abreu, E., Herrera-Estrella, L. (2006) Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of Arabidopsis to phosphorus deficiency. *Plant Physiology*, **140**, 879-889. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.105.073825

[20] Williamson, L.C., Ribrioux, S.P.C.P., Fitter, A.H., Leyser, H.M.O. (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **126**, 875-882. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.126.2.875>

[21] Köleli, N., Eker, S., Cakmak, I. (2004) Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil. *Environmental Pollution*, **131**, 453-459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2004.02.012>

[22] Lambert, R., Grant, C., Sauvé, S. (2007) Cadmium and zinc in soil solution extracts following the application of phosphate fertilizers. *Science of the Total Environment*, **378**, 293-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.008>

[23] Gao, X., Mohr, R.M., McLaren, D.L., Grant, C.A. (2011) Grain cadmium and zinc concentrations in wheat as affected by genotypic variation and potassium chloride fertilization. *Field Crops Research*, **122**, 95-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2011.03.005>

[24] Rojas-Cifuentes, G.A., Johnson, B.L., Berti, M.T., Norvell, W.A. (2012) Zinc fertilization effects on seed cadmium accumulation in oilseed and grain crops grown on North Dakota soils. *Chilean Journal of Agricultural Research*, **72** (1), 117-124. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000100019>

[25] Gupta, D.K., Chatterjee, S., Datta, S., Veer, V., Walther, C. (2014) Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. *Chemosphere*, **108**, 134-144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.030>

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

[26] Salah, S.A. and Barrington, S.F. (2006) Effect of soil fertility and transpiration rate on young wheat plants (*Triticum aestivum*) Cd/Zn uptake and yield., *Agricultural Water Managment*, **82**, 177-192. <http://dx.doi.org/0.1016/j.agwat.2005.06.002>

Spéciation du Cadmium dans la culture hydroponique de *Lactuca sativa*

Pour modéliser la spéciation du Cd dans la culture hydroponique de *Lactuca sativa*, le modèle Visual MINTEQ a été utilisé. C'est un modèle qui calcule l'équilibre de la distribution des espèces chimiques dans une solution aqueuse en se basant sur les processus de fixation des ETM sur une interface solide/liquide développés dans la section § I.2.8 (Hong et al. 2010). Tous les ions de la solution nutritive en concentration molaire ont été pris en considération dans le calcul sous un pH égal à 6 et une température de 25°C. Huit formes de Cd (CdCl^+ , Cd^{2+} , CdHPO_4 , CdCl_2 , CdSO_4 , $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2^{2-}$, CdNO_3^+ et $\text{CdH}_2\text{BO}_3^+$) ont été identifiées dans la solution Hoagland par le programme Visual MINTEQ. En augmentant la concentration de P dans le milieu de P0 à P1 (123,34 mg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{L}$) à P2 (585 mg $\text{P}_2\text{O}_5/\text{L}$), l'abondance de CdHPO_4 augmente et toutes ces formes sont dissoutes à 100%. Plus précisément, dans les traitements en absence de P et en présence de Cd (P0Cd1, P0Cd2, P0Cd3 et P0Cd4) le Cd est majoritairement sous forme de Cd^{2+} (50%) et CdCl^+ (45%) (**Figure 35**).

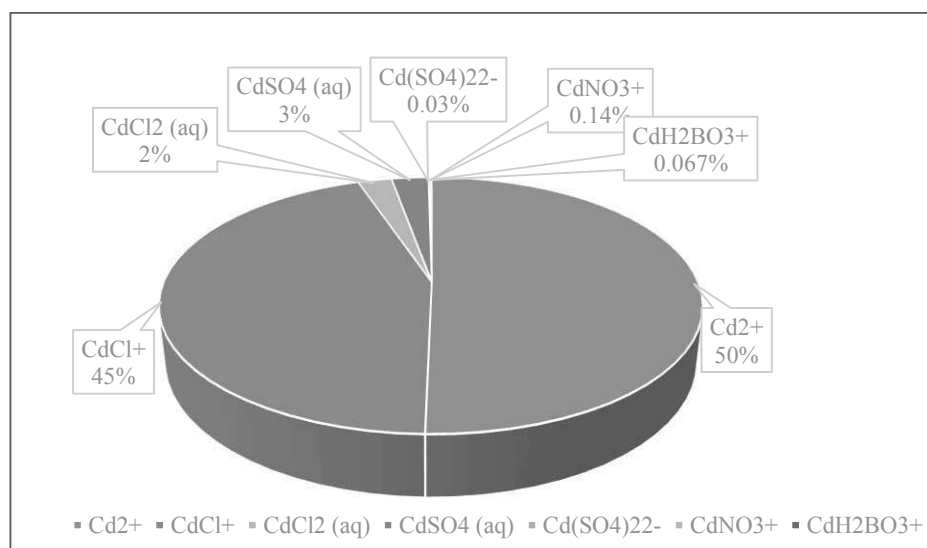


Figure 35 Formes du cadmium dans les milieux en absence de P.

En augmentant le P dans la solution nutritive (P1Cd1, P1Cd2, P1Cd3 et P1Cd4), on a une diminution minimale du Cd^{2+} et du CdCl^+ et une présence de 3% du CdHPO_4 (**Figure 36**).

Effect of cadmium on *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture enriched with phosphate fertilizer

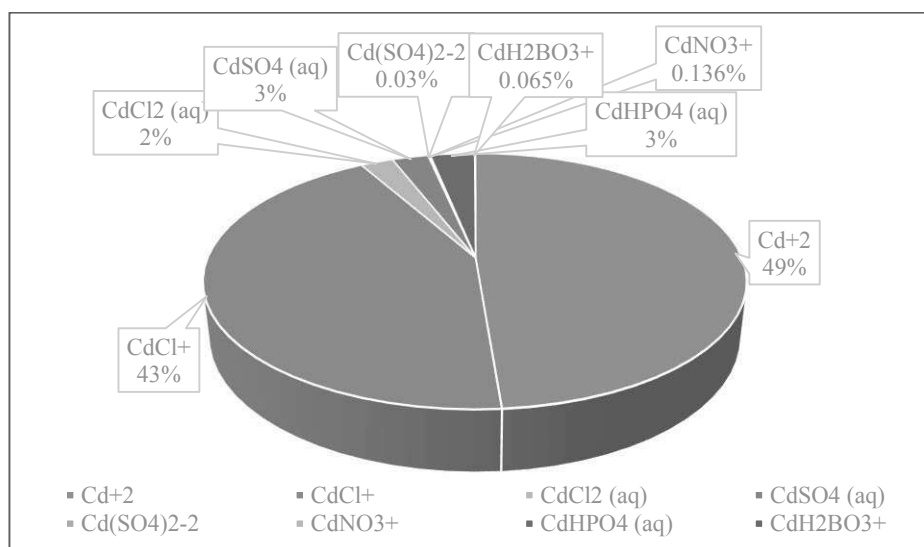


Figure 36 Formes du cadmium dans les milieux en présence de P (123,34 mg P₂O₅/L).

Avec P égale à 585 mg P₂O₅/L et avec les concentrations croissantes du Cd (0,093; 0,186; 0,279 et 0,372 mg Cd/L), on a une teneur plus élevée du Cd sous forme de CdHPO₄ (**Figure 37**).

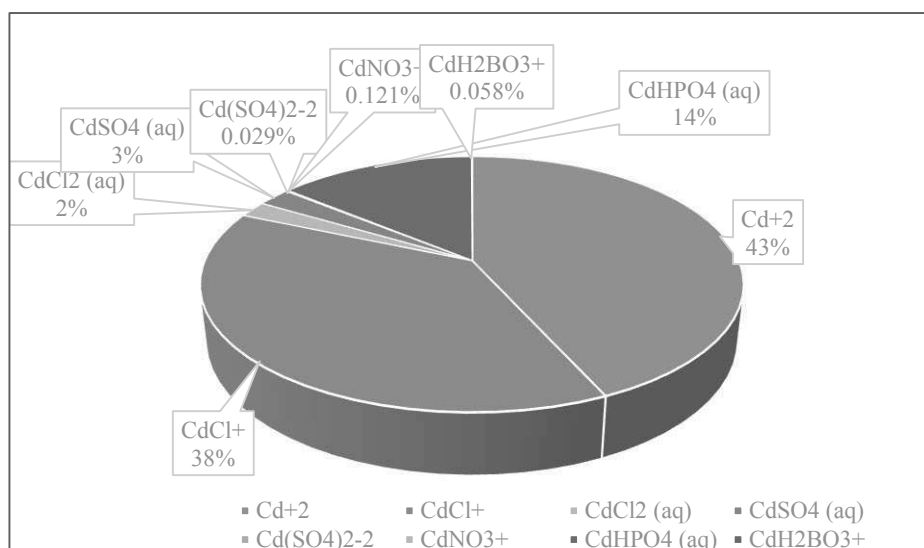


Figure 37 Formes du cadmium dans les milieux en présence de P (585 mg P₂O₅/L).

Dans les différents traitements, 38 à 45%, 43 à 50% du cadmium se trouve sous forme libre CdCl⁺ et Cd²⁺ respectivement. D'après Welch and Norvell (1999) and Wagglar et al. 2004 ces deux formes de Cd sont considérées comme formes biodisponibles pour la plante. Dans cette partie de notre travail, la biodisponibilité a été prédite au travers de deux approches ; tout d'abord en analysant les teneurs en Cd dans les racines et les parties aériennes de *Lactuca*

sativa cultivée en hydroponie et ensuite en modélisant les formes du Cd à l'aide d'un calcul géochimique. Les teneurs en Cd dans les parties aériennes dépassaient le seuil de phytotoxicité préconisé par la directive européenne 1881/2006. D'ailleurs, quatre plantes seulement ont montré des symptômes de toxicité tels que la nécrose ou la mort. Ce résultat est surprenant puisque les concentrations de Cd étaient très élevées mais on peut expliquer ceci par la formation de CdHPO_4 qui est moins disponible et la proportion absorbée de Cd a été minimisée. Cette conclusion répond aux doutes dans les sections précédentes de la formation de complexe P-Cd dans le sol empêchant ou ralentissant la migration du Cd dans le profil du sol ou la diminution de l'absorption du Cd en fertilisation phosphatée par exemple. La spéciation du Cd peut être aussi évaluée par des extractions chimiques : sélectives et séquentielles et va dépendre de plusieurs paramètres du sol comme cité dans la section § I.2.9. Dans les sols acides, le métal semble lier aux phases échangeables, oxydables ainsi qu'à la phase réductible. En revanche, dans les sols calcaires, il est lié principalement à la phase oxydable et, dans une moindre mesure, aux phases réductibles et acido-solubles et c'est dans les sols argileux qu'il est lié à la phase réductible. Il serait donc intéressant d'étudier la spéciation du Cd dans le sol typique libanais pour évaluer d'une façon exacte sa biodisponibilité aux plantes.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Au Liban, l'agriculture représente une force économique considérable pour le pays. Actuellement, l'agriculture est face à de nombreux problèmes dont l'arrêt d'exportation de ses productions agricoles comme conséquence de la guerre en Syrie et en Iraq. A cette difficulté s'ajoute les problèmes d'eutrophisation qui a pris plus d'attention dans le monde agricole dans les dernières décennies et les problèmes liés à l'accumulation des ETM dans les sols suite à l'amendement démesuré des engrais phosphatés. Le monde a pris conscience des impacts de la consommation excessive d'engrais et plusieurs travaux ont été réalisés et ont abouti à des recommandations préventives pour réguler la fertilisation. Cependant, plus d'investissement a été accordé sur le transfert des ETM, leur devenir et leur migration vers les composants de l'écosystème à partir des sols acides et sableux sous des climats humides. A l'échelle régionale et particulièrement à l'échelle nationale, il n'existe pas des études consistantes qui mettent en évidence l'impact de l'usage des fertilisants sur les sols alcalins dans un climat aride à semi-aride. Dans ce cadre, les objectifs de la thèse ont été conçus pour suivre les ETM dans les sols typiques Est Méditerranéen où règne un climat aride à semi-aride et déterminer leurs effets sur des cultures typiques dans le pays. Au début, il a fallu identifier les apports en ETM par les fertilisants chimiques phosphatés pour en terminer par évaluer l'apport annuel de ces ETM au sol étudié.

Une relation entre les sulfates, le cadmium et le calcium et une autre entre le Zn et le Pb ont été déterminée dans les fertilisants phosphatés les plus commercialisés dans la région. 65% de ces engrais ont une teneur en Cd supérieure aux normes en Allemagne et dans d'autres pays. L'apport moyen annuel de Zn, Cu, Pb et Cd a été estimé de 922, 124, 26 et 6 g/ha/an respectivement. Bien que ces apports soient inférieurs aux limites du Brésil et de la Grande-Bretagne mais de telles concentrations sont relativement élevées en prenant en considération la nature alcaline du sol étudié et le climat aride et semi-aride. Ce travail est d'un intérêt national aussi bien que régional pour mettre en place un programme de législation et de réglementation qui prend en considération les particularités climatiques et pédologiques des pays Est-méditerranéens surtout que ceci va poser des problèmes de sécurité alimentaire et ça va poser des avis concernant l'exportation.

Afin de mieux comprendre la migration des ETM dans le sol, il a fallu évaluer les phénomènes qui guident la mobilité et le transfert des ETM dans une échelle mesurable qui permet de suivre la cinétique de transfert et de migration dans un système de colonne de sol ayant une culture végétale (*Lactuca sativa*) typiquement consommée dans les pays de la région. Dans cette

partie, une caractérisation du sol non fertilisé a été effectuée pour identifier et contrôler les différences entre le sol non fertilisé et le sol fertilisé. Par conséquent, la contamination du sol alcalin par du Cd avait un effet négatif sur la croissance de *Lactuca sativa* et de l'ANR mais aussi un effet positif sur la production de chlorophylle tandis que l'engrais phosphaté utilisé avait un rôle amplificateur de cette croissance. Malgré les quantités élevées de Cd utilisées, *Lactuca sativa* a poussé, c'est développée et a résisté au stress du Cd dans un sol argileux basique. Dans les sols compactés contaminés en Cd, amendés en fertilisant phosphaté ou non, la migration du cadmium était ralentie. Au contraire de ce qu'on pense, la compaction ne peut pas être une barrière contre le transfert ou la bioaccumulation du Cd. Cependant la compaction a favorisé le transfert du Cd des racines à la partie aérienne et la fertilisation phosphatée du sol compacté a favorisé la bioaccumulation du Cd dans *Lactuca sativa*.

Les effets de la compaction du sol alcalin, la présence des fertilisants et du cadmium n'ont pas été évalués seulement sur les caractères morphologiques, physiologiques des laitues et sur la migration et le transfert du cadmium, mais aussi sur les interactions du système sol-microbiologie-plante. Cependant, la compaction et la profondeur du sol a engendré une diminution de la population microbienne à l'exception des bactéries résistantes au cadmium qui ont augmenté en présence du cadmium. Les micro-organismes solubilisant le phosphate sont stimulés en présence de cadmium et de phosphore séparément. La présence du cadmium a stimulé les activités enzymatiques surtout celle de l'acide phosphatase et la présence du phosphore a défavorisé l'activité de la phosphatase alcaline. Dans les conditions marquées par la présence du cadmium, du phosphate et de sol compacté, l'effet positif du phosphate a été masqué par celui du Cd conduisant à une diminution des nombres de bactéries totaux et de champignons. Ceux des micro-organismes solubilisant le phosphate et les bactéries résistantes au cadmium ont augmenté.

Le concept de la culture hydroponique des laitues a été développé pour discuter les effets du cadmium et du phosphore sur les propriétés physiques des laitues et l'absorption du cadmium en absence du sol. La croissance des laitues s'est révélée plus importante dans la culture hydroponique en la comparant à la culture des laitues en présence du sol alcalin comme matrice de sorption. Le phosphate a joué un rôle amplificateur dans le développement du système racinaire des laitues tandis que le cadmium à des concentrations élevées a engendré systématiquement la nécrose et occasionnellement la mort des plantes. Le Zn était abondant le plus dans la partie aérienne des laitues tandis que le Fe et le Cd dans les racines. A grande

concentration de P et en augmentant la concentration de Cd, l'absorption de ce métal a augmenté ainsi que son transfert à la partie aérienne. Malgré la rapidité de croissance en utilisant la culture hydroponique, ce système pourra devenir une source potentielle du cadmium qui est transféré vers les laitues puisque les formes du Cd les plus abondantes trouvées dans la solution nutritive sont les CdCl^+ et Cd^{2+} qui sont biodisponibles aux plantes. Or, la disponibilité du Cd dépend des propriétés physico-chimiques des sols qui elles mêmes contrôlent la spéciation du métal dans le sol. De plus, il est admis que les plantes influencent physiquement et chimiquement leur environnement racinaire et par conséquent la spéciation et la biodisponibilité de métaux.

Finalelement, cette étude a fourni une base de données considérable sur les engrais chimiques phosphatés commercialisés au Liban et les pays voisins et a permis d'évaluer le niveau de contamination des sols en ETM suite à la fertilisation excessive en absence de réglementations qui respectent les quantités maximales à mettre en œuvre dans les pratiques agricoles.

A la suite de ces travaux, plusieurs perspectives peuvent être ressorties de la thèse. Ainsi, la mobilité et le bilan de distribution du phosphore dans le sol, la couverture végétale et l'eau d'irrigation devront faire l'objet d'une investigation ultérieure. Une telle réalisation dans le contexte des sols alcalins permettra la prédiction du devenir de certains ETM et leurs répartitions. L'utilisation des méthodes comme le DGT *in situ* et l'usage des bougies poreuses sont des étapes nécessaires pour évaluer qualitativement et quantitativement les parts des ETM biodisponibles. Le suivi des comportements de certains ETM comme le Pb, l'As et le Ni et leurs devenirs quand ils sont rajoutés dans les sols alcalins sous un climat aride à semi-aride à travers des pratiques agricoles incontrôlées est une étape obligatoire pour orienter les législateurs vers des lois et restrictions plus exigeantes concernant l'usage des engrais chimiques. Comme la culture des laitues, celles du blé, du maïs, des choux sont des cultures assez abondantes et étendues dans les pays Est Méditerranéen. Ainsi, la généralisation de notre étude sur ces types d'agriculture sera d'un grand intérêt qui garantit des législations plus restrictives concernant l'amendement des fertilisants chimiques dans de tels sols particulièrement alcalins qui évoluent sous des conditions arides visiblement influencées par les changements climatiques.

RÉFÉRENCES

- Abdel-haleem A.S., Sroor A., El-bahi S.M., Zohny E. (2001). Heavy metals and rare earth elements in phosphate fertilizer components using instrumental neutron activation analysis. *Applied Radiation and Isotopes*, 55: 569-573.
- Abouzeid A.-Z.M. (2008). Physical and thermal treatment of phosphate ores-An overview. *International Journal of Mineral Processing*, 85: 59-84.
- Aghababaei F., Raiesi F., Hosseinpur A. (2014). The combined effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on microbial biomass and enzyme activities in a calcareous soil spiked with cadmium. *Applied Soil Ecology* 75: 33-42.
- Ahsan H., Chen Y., Parvez F., Zablotzka L., Argos M., Hussain I., Momotaj H., Levy D., Cheng Z., Slavkovich V., van Geen A., Howe G.R, Graziano, J.H. (2006). Arsenic exposure from drinking water and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh: Baseline results from the health effects of arsenic longitudinal study. *American Journal of Epidemiology*, 163 (12): 1138-1148.
- Akrong M.O., Cobbina S.J., Ampofo, J.A. (2012). Assessment of Heavy Metals in Lettuce Grown in Soils Irrigated with Different Water Sources in the Accra Metropolis. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*, 4 (5): 576-582.
- Alexander P.D., Alloway B.J., Dourado, A.M. (2006). Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution*, 144: 736-745.
- Alexandratos N. (1999). PLANTS AND POPULATION: IS THERE TIME? World food and agriculture: Outlook for the medium and longer term (May 1999 in California, USA). *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 96 (11): 5908-5914.
- Al-Hwaiti M.S., Ranville J.F., Ross P.E. (2010). Bioavailability and mobility of trace metals in phosphogypsum from Aqaba and Eshidiya, Jordan. *Chemie Der Erde*, 70: 283-291.
- Alloway B.J. Heavy metals in soils. 2e éd. New York, Chapman & Hall, 1995. Chapitre 3: The origin of heavy metals in soils, p. 38-57.
- Alper H., Baskerville G.L., Caldwell W.G.E., Campbell C., Gubins S., Ladanyi B., Lewis W.H., May A.W., Scudder G.G.E., Dancik B.P. (2002). Le système canadien de classification des sols. Direction générale de la recherche, Ministère de l'Agriculture et de Agro-Alimentaire du Canada. 196 p. Publication 1646. (L.P. scientifiques du CNRC, Troisième édition.). Ottawa, Canada.
- Armas T., Pinto A.P., de Varennes A., Mourato M.P., Martins L.L., Gonçalves Simões L.L., Mota A.M. (2015). Comparison of cadmium-induced oxidative stress in *Brassica juncea* in soil and hydroponic cultures. *Plant and Soil*, 388 (1-2): 297-305.

- Arnon D.I. (1949). Plant physiology: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *American Society of Plant Biologists*, 24 (1): 1-16.
- Arora M., Kiran B., Rani S., Rani A., Kaur B., Mittal N. (2008). Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chemistry*, 111: 811-815.
- Ashworth D.J., Alloway B.J. (2008). Influence of dissolved organic matter on the solubility of heavy metals in sewage-sludge-amended soils. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 39: 538-550.
- Asmar F.R. (2011). Country pasture/Forage resource profiles, p. 5-43.
- Astolfi S., Zuchi S., Passera, C. (2004). Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil or hydroponic culture. *Biologia Plantarum*, 48 (3): 413-418.
- AUB. (2014). Impact of population growth and climate change on water scarcity, agricultural output and food security. Beirut, Lebanon.
- Aydin I., Imamoglu S., Aydin F., Saydut A., Hamamci C. (2009). Determination of mineral phosphate species in sedimentary phosphate rock in Mardin, SE Anatolia, Turkey by sequential extraction. *Microchemical Journal*, 91: 63-69.
- Aydin I., Aydin F., Saydut A., Bakirdere E.G., Hamamci C. (2010). Hazardous metal geochemistry of sedimentary phosphate rock used for fertilizer (Mazıdag, SE Anatolia, Turkey). *Microchemical Journal*, 96: 247-251.
- Bakir F., Rustam H., Tikriti S., Al-Damluji S.F., Shihristani H. (1980). Clinical and epidemiological aspects of methylmercury poisoning. *Postgraduate Medical Journal*, 56: 1-10.
- Barton C.D., Karathanasis A.D. (2003). Influence of soil colloids on the migration of atrazine and zinc through large soil monoliths. *Water, Air and Soil Pollution*, 143: 3-21.
- Bashour I. Arab Environment: Future Challenges. Beirut-Liban, M. Tolba & N. Saab éd., 2008. Chapitre 10: Pesticides, Fertilizers and Food Safety: Report of the Arab Forum for Environment and Development (AFED) and Technical Publications, p. 137-144.
- Basta N.T., Ryan J.A., Chaney R.L. (2005). Trace element chemistry in residual-treated soil: key concepts and metal bioavailability. *Journal of Environmental Quality*, 34: 49-63.
- Belon E., Boisson M., Deportes I.Z., Eglin T.K., Feix I., Bispo A.O., Galsomies I., Leblond S., Guellier C.R. (2012). An inventory of trace elements inputs to French agricultural soils. *Science of The Total Environment*, 439: 87-95.
- Bensefa-Colas L., Andujar P., Descatha A. (2011). Intoxication par le mercure. *La Revue de Médecine Interne*, 32: 416-424.

- Bernier M., Levy G.J., Fine P., Borisover M. (2013). Organic matter composition in soils irrigated with treated wastewater : FT-IR spectroscopic analysis of bulk soil samples. *Geoderma*, 209-210: 233-240.
- Berry W.L. & Knight S. *Plant growth Chamber Handbook*, 1997. Chapitre 8: Plant Culture in Hydroponics p. 119-132.
- Bonn Zu. *Influence des systèmes agraires sur l'utilisation des terroirs, la séquestration du carbone et la sécurité alimentaire dans le bassin versant de l'Ouémé supérieur au Bénin*, 235 p. Thèse de Doctorat de l'Université Rheinischen Friedrich-Wilhelm: 2005.
- Bradl H.B. (2004). Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 277: 1-18.
- Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health (2007), update 7.0
- Camobreco V.J., Richards B.K., Steenhuis T.S., Peverly J.H., McBride, M.B. (1996). Movement of heavy metals through undisturbed and homogenized soil column. *Soil Science*, 161: 740-750.
- Carvalho F.P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Sciences & Policy*: 9: 685-692.
- Cevik U., Baltas H., Tabak A., Damla N. (2010). Radiological and chemical assessment of phosphate rocks in some countries. *Journal of Hazardous Materials*, 182: 531-535.
- Chaignon V. *Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées . -Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides-*, 183 p. Thèse de Doctorat de l'Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille: 2001.
- Chaignon V., Sanchez-Neira I., Hermann P., Jaillard B., Hinsinger P. (2003). Copper bioavailability and extractibility as related to chemical properties of contaminated soils from a wine-growing area. *Environmental Pollution*, 123 (2): 229-238.
- Chang A.C., Page A.L. (2000). Trace elements slowly accumulating, depleting in soils. *California Agriculture*, 54 (2): 49-55.
- Chauhan P., Chauhan R.P., Gupta, M. (2013). Estimation of naturally occurring radionuclides in fertilizers using gamma spectrometry and elemental analysis by XRF and XRD techniques. *Microchemical Journal*, 106: 73-78.
- Chen G.C., He Z.L., Stoffella P.J., Yang X.E., Yu S., Yang J.Y., Calvert, D.V. (2006). Leaching potential of heavy metals (Cd, Ni, Pb, Cu and Zn) from acidic sandy soil amended with dolomite phosphate rock (DPR) fertilizers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20: 127-133.
- Chen S., Li-na S., Qi-xing Z., Lei C. (2006). Influences of phosphate nutritional level on the phytoavailability and speciation distribution of cadmium and lead in soil. *Journal of Environmental Sciences*, 18 (6): 1247-1253.

- Chen S., Sun L., Sun T., Chao L., Guo G. (2007). Interaction between cadmium , lead and potassium fertilizer (K_2SO_4) in a soil-plant system. *Environmental Geochemistry and Health*, 29: 435-446.
- Chen W., Chang A.C., Wu L. (2007). Assessing long-term environmental risks of trace elements in phosphate fertilizers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 48-58.
- Chien S.H., Prochnow L.I., Tu S., Snyder C.S. (2011). Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 89: 229-255.
- Chihching C., Yumei K., Changchieh C., Chunwei H., Chihwei Y., Weijen Y. (2008). Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences*, 20: 359-363.
- Chlopecka A., Adriano, D.C. (1997). Influence of zeolite, apatite and Fe-oxide on Cd and Pb uptake by crops. *Science of The Total Environment*, 207: 195-206.
- Chuan M.C., Shu G.Y., Liu J.C. (1996). Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water, Air and Soil Pollution*, 90: 543-556.
- Comair F. (2011). L'efficience d'utilisation de l'eau et approche économique. Plan Bleu, centre d'activités régionales PNUE/PAM, 44 p.
- Darwish T., Atallah T., Hajhasan S., Chranek A. (2003). Management of nitrogen by fertigation of potato in Lebanon. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 67: 1-11.
- Darwish T.K., Faour M., Masri G., Shaaban T., Bou Kheir R. (2004). UNITED NATIONS/ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN REGIONAL WORKSHOP. Land Degradation in Lebanon: Vulnerability of Soil Resources to Desertification 47 p.
- Darwish T.M., Jomaa I., Awad M., Boumetri R. (2008). Preliminary Contamination Hazard Assessment of Land Resources in Central Bekaa Plain of Lebanon. *Lebanese Science Journal*, 9 (2): 3-15.
- Darwish T., Atallah T., Francis R., Saab C., Jomaa I., Shaaban A., Sakka H., Zdruli P. (2011). Observations on soil and groundwater contamination with nitrate: A case study from Lebanon-East Mediterranean. *Agricultural Water Management*, 99: 74-84.
- Davranche M., Bollinger, J. (2000). Heavy metals desorption from synthesized and natural iron and manganese oxyhydroxides : Effect of reductive conditions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 227: 531-539.
- De Temmerman L., Waegeneers N., Claeys N., Roekens E. (2009). Comparison of concentrations of mercury in ambient air to its accumulation by leafy vegetables : An important step in terrestrial food chain analysis. *Environmental Pollution*, 157: 1337-1341.
- Defo C., Yerima B.P.K., Noumsi I.M.K., Bemmo N. (2015). Assessment of heavy metals in soils and groundwater in an urban watershed of Yaoundé (Cameroon-West Africa). *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 77-93.

- Denaix L. *Transfert sol-eau-plante d'éléments traces dans les écosystèmes cultivés contaminés*, 117 p. Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches à l'Université de Pau et des pays de l'Adour: 2007
- Dias, M.C, Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., Santos, C. (2012) Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1281-1289.
- Djordjic F., Borling K., Bergstrom L. (2004). Phosphorus Leaching in Relation to Soil Type and Soil Phosphorus Content. *Journal of Environmental Quality*, 33: 678-684.
- Domingues D.S., Takahashi H.W., Camara C.A.P., Nixdorf S.L. (2012). Automated system developed to control pH and concentration of nutrient solution evaluated in hydroponic lettuce production. *Computers and Electronics in Agriculture*, 84: 53-61.
- Duquette M.-C. *Mesure de la concentration en métaux traces dans la solution de sol par la microlysime*, 147 p. Mémoire de Maître en Sciences en Géographie à l'Université de Montréal: 2010.
- Durand, A., Piutti, S., Rue, M., Morel, J.L., Echevarria, G., Benizri, E. 2015. Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Soil*, <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-015-2691-2>
- Dzombak D.A., Fish W., Morel F.M.M. (1986). Metal-humate interactions. 1. discrete ligand and continuous distribution models. *Environmental Science & Technology*, 20 (7): 669-675.
- Ekino S., Susa M., Ninomiya T., Imamura K., Kitamura T. (2007). Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of Neurological Sciences*, 262: 131-144.
- Emmerich W.E., Lund L.J., Page A.L., Chang A.C. (1982). Predicted Solution Phase Forms of Heavy Metals in Sewage Sludge-Treated Soils. *Journal of Environmental Quality*, 11 (2): 182-186.
- FAO (2006a). Éradiquer la faim dans le monde-bilan 10 ans après le Sommet mondial de l'alimentation. In *L'état de l'insécurité alimentaire dans le monde*. Rome, Italie: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- FAO (2006b). Fertilizer use by crop. In *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin*. Rome, Italy.
- FAO (2012). Investir dans l'agriculture pour un avenir meilleur. In *La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture* (p. 1-184). Rome, Italy.
- FAO & IFA (2000). *Fertilizers and their use*, Fourth edition. Rome: FAO, IFA. 29 p.
- Farajalla N., Marktanner M., Dagher L., Zgheib P. (2010). The National Economic, Environment and Development Studies (NEEDS) for Climate Change Project. Project-

- Final Report, Issam Fares Institute for Public Policy and International Affairs- American University of Beirut, Beirut
- Fernandez-Cornudet C. *Devenir du Zn, Pb et Cd issus de retombées atmosphériques dans les sols, à différentes échelles d'étude. Influence de l'usage des sols sur la distribution et la mobilité des métaux*, 232 p. Thèse de Doctorat de l'Institut National d'Agronomie Paris-Grignon INA-PG: 2006
- François M., Grant C., Lambert R., Sauvé S. (2009). Prediction of cadmium and zinc concentration in wheat grain from soils affected by the application of phosphate fertilizers varying in Cd concentration. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 83: 125-133.
- Gadd G.M., Griffiths A.J. (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4: 303-317.
- Gao Y., Zhou P., Mao L., Zhi Y., Zhang C., Shi W. (2010). Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. *Journal of Environmental Sciences*, 22 (7): 1040-1048.
- Gao X., Mohr R.M., McLaren D.L., Grant C.A. (2011). Grain cadmium and zinc concentrations in wheat as affected by genotypic variation and potassium chloride fertilization. *Field Crops Research*, 122: 95-103.
- Geara D., Moilleron R., El Samrani A., Lorgeoux C., Chebbo G. (2010). State of art about water uses and wastewater management in Lebanon. *Lebanese Science Journal*, 11 (2): 139-152.
- Gilland B. (2002). World population and food supply Can food production keep pace with population growth in the next half-century? *Food Policy*, 27: 47-63.
- Giordano P.M. & Mortvedt J.J. (1976). Nitrogen Effects on Mobility and Plant Uptake of Heavy Metals in Sewage Sludge Applied to Soil Columns. *Journal of Environmental Quality*, 5 (2): 165-168.
- Giroud J.-P., Bottero A. (1972). Influence des propriétés physico-chimiques des argiles monominérales sur leur comportement mécanique. *Bull. Liaison Labo. P. et Ch.*, 62: 105-116.
- Giuffré L., Ratto S., Marbán L. (1997). Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Science of the Total Environment*, 204: 245-250.
- Grant C.A. (2011). Influence of phosphate fertilizer on cadmium in agricultural soils and crops. *Pedologist*, 143-155.
- Grant C.A., Bailey L.D. (1997). Effects of Phosphorus and Zinc Fertiliser Management on Cadmium Accumulation in Flaxseed. *Journal of Science Food Agriculture*, 73: 307-314.

- Grant C.A., Monreal M.A., Irvine R.B., Mohr R.M., McLaren D.L., Khakbazan M. (2010). Preceding crop and phosphorus fertilization affect cadmium and zinc concentration of flaxseed under conventional and reduced tillage. *Plant and Soil*, 333: 337-350.
- Gray C.W., McLaren R.G., Roberts A.H.C., Condon, L.M. (1999). The effect of long-term phosphatic fertiliser applications on the amounts and forms of cadmium in soils under pasture in New Zealand. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 54: 267-277.
- Greenwood R, Kendall K.(1999). Selection of suitable dispersants for aqueous suspensions of zirconia and titania powders using acoustophoresis. *Journal of European Ceramic Society*, 19: 479-488.
- Guo Y.-B., Feng H., Chen C., Jia C.-J., Xiong F., Lu Y. (2013). Heavy Metal Concentrations in Soil and Agricultural Products Near an Industrial District. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22 (5): 1357-1362.
- Gupta D.K., Chatterjee S., Datta S., Veer V., Walther C. (2014). Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. *Chemosphere*, 108: 134-144.
- Hajar L., Haidar-Boustani M., Khater C., Cheddadi R. (2010). Environmental changes in Lebanon during the Holocene: Man vs. climate impacts. *Journal of Arid Environments*, 74: 746-755.
- Harada M., Akagi H., Tsuda T., Kizaki T., Ohno H. (1999). Methylmercury level in umbilical cords from patients with congenital Minamata disease. *Science of The Total Environment*, 234: 59-62.
- Hartmann A., Rothballer M., Schmid M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312: 7-14.
- He Q.B., Singh B.R. (1994). Crop uptake of cadmium from phosphorus fertilizers: I. Yield and cadmium content. *Water, Air and Soil Pollution*, 74: 251-265.
- Hong C.O., Chung D.Y., Lee D.K., Kim P.J. (2010). Comparison of phosphate materials for immobilizing cadmium in soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 268-274.
- Hubert F. *Modélisation des diffractogrammes de minéraux argileux en assemblages complexes dans deux sols de climat tempéré. Implications minéralogique et pédologique*, 222 p. Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers: 2009
- Huguet S. *Etude du devenir du cadmium dans un sédiment de curage fortement contaminé et des mécanismes d'accumulation du cadmium chez Arabidopsis halleri*, 336 p. Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1: 2009
- Huynh T.M.D. *Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ver de terre/microflore tellurique*, 153 p. Thèse de Doctorat de l'Université Paris Est: 2009

- Inaba T., Kobayashi E., Suwazono Y., Uetani M., Oishi M., Nakagawa H., Nogawa K. (2005). Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicology Letters*, 159: 192-201.
- Index mundi, Lebanon exports by commodity in US Dollars - Lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium spp.*) - Yearly
<http://www.indexmundi.com/trade/exports/?country=lb&subchapter=0705>.
- Javied S., Mehmood T., Chaudhry M.M., Tufail M., Irfan, N. (2009). Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchemical Journal*, 91: 94-99.
- Jaworski E.G. (1971). Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43 (6): 1274-1279.
- Jiao W., Chen W., Chang A.C., Page A.L. (2012) Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environmental Pollution*, 168, 44-53.
- Jiao Y., Grant C.A., Bailey L.D. (2004). Effects of phosphorus and zinc fertilizer on cadmium uptake and distribution in flax and durum wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 777-785.
- Jusoff K. (1991). Effect of compaction of soils on growth of *Acacia mangium* Willd. under glasshouse conditions. *New Forests*, 5: 61-66.
- Kabata-pendias A. (1993). Behavioural properties of trace metals in soils. *Applied Geochemistry*, (2): 3-9.
- Kabata-Pendias A. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants* (Fourth Edition.). Taylor and Francis Group, CRC Press.
- Kanbar H.J, Hanna N., El-Samrani A.G., Kobaissi A., Harb N., Amacha N. (2014) Metal binding in soil cores and sediments in the vicinity of a dammed agricultural and industrial watershed. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186 (12): 8793-8806.
- Karam F., Mounzer O., Sarkis F., Lahoud R. (2002). Yield and nitrogen recovery of lettuce under different irrigation regimes. *Journal of Applied Horticulture*, 4 (2): 70-76.
- Karathanasis A.D. (1999). Subsurface migration of copper and zinc mediated by soil colloids. *Soil Science Society of America Journal*, 63 (4): 830-838.
- Karathanasis A.D., Johnson D.M.C. (2006). Subsurface transport of Cd, Cr, and Mo mediated by biosolid colloids. *Science of The Total Environment*, 354: 157-169.
- Kashem M.A., Singh B.R. (2001). Metal availability in contaminated soils: I. Effects of flooding and organic matter on changes in Eh , pH and solubility of Cd , Ni and Zn. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 61: 247-255.

- Keck G. (2002). Contaminants et résidus chimiques dans les aliments d'origine animale. *Revue Française Des Laboratoires*, 348: 21-27.
- Kelly J.J., Haggblom M.M., Tate R.L. (2003). Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. *Biology & Fertility of Soils*, 38: 65-71.
- Khan S., Rehman S., Zeb A., Khan M.A., Shah M.T. (2010). Soil and vegetables enrichment with heavy metals from geological sources in Gilgit, northern Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1820-1827.
- Knox A.S., Kaplan D.I., Paller M.H. (2006). Phosphate sources and their suitability for remediation of contaminated soils. *Science of The Total Environment*, 357: 271-279.
- Köleli N., Eker S., Cakmak I. (2004). Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil. *Environmental Pollution*, 131: 453-459.
- Kuboi T., Noguchi A., Yazaki J. (1986). Family-dependent cadmium accumulation characteristics in higher plants. *Plant and Soil*, 92: 405-415.
- Kumar S., Chaudhuri S., Maiti S.K. (2013). Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine Soil-A review. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 13 (7): 898-906.
- Le Roux A. (1972). Caractéristiques mécaniques des roches argileuses en relation avec leur texture (p. 155-178).
- Lee T., Lai H.-Y., Chen Z.-S. (2004). Effect of chemical amendments on the concentration of cadmium and lead in long-term contaminated soils. *Chemosphere*, 57: 1459-1471.
- Li C.H., Ma B.L., Zhang T.Q. (2002). Soil bulk density effects on soil microbial populations and enzyme activities during the growth of maize (*Zea mays* L.) planted in large pots under field exposure. *Canadian Journal of Soil Sciences*, 147-154.
- Li Q., Cai S., Mo C., Chu B., Peng L., Yang, F. (2010). Toxic effects of heavy metals and their accumulation in vegetables grown in a saline soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 84-88.
- Li W.C., Wong, M. (2010). Effects of bacteria on metal bioavailability, speciation, and mobility in different metal mine soils: a column study. *Journal of Soils Sediments*, 2010 (10): 313-325.
- Lin D., Ouyang Y., Huang C.H., Huang D.Y. (2010). Characterization of heavy metals from banana farming soils. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 38 (5-6): 430-436.
- Lindsay W.L., Norvell W.A. (1978). Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America*, 42: 421-428.
- Luo L., Ma Y., Zhang S., Wei D., Zhu Y.-G. (2009). An inventory of trace element inputs to agricultural soils in China. *Journal of Environmental Management*, 90: 2524-2530.

- Luo C., Liu C., Wang Y., Liu X., Li F., Zhang G., Li X. (2011). Heavy metal contamination in soils and vegetables near an e-waste processing site, south China. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 481-490.
- Manceau A., Marcus M.A., Nobumichi T. (2002). Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. In P. Fenter, M. Rivers, N. Sturchio, & S. Sutton (Eds.), *Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science* (p. 341-428).
- Mar S.S., Okazaki M. (2012). Investigation of Cd contents in several phosphate rocks used for the production of fertilizer. *Microchemical Journal*, 104: 17-21.
- Marseille F., Denot A. (2007). Mobilité et biodisponibilité des contaminants présents dans les sols aux abords des infrastructures et impact sur la santé - Rapport intermédiaire. Utilisation de CALTOX pour la dispersion multimédia. n° procert: 52311-11. Lyon (p.1-85).
- Maruyama K., Yorifuji T., Tsuda T., Sekikawa T., Nakadaira H., Saito, H. (2012). Methyl mercury exposure at Niigata, Japan: Results of neurological examinations of 103 adults. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-7.
- Massenet J.-Y. (2012). Propriétés physique du sol (p. 1-54).
- Matong J.M., Nyaba L., Nomngongo P.N. (2016). Fractionation of trace elements in agricultural soils using ultrasound assisted sequential extraction prior to inductively coupled plasma mass spectrometric determination. *Chemosphere*, 154: 249-257.
- Mathieu-Huart A., De Lentdecker C., Rivière G., Sissoko F., Rousselle C. (2014). Valeurs sanitaires de référence (VR) de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). *Archives Des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 75: 292-301.
- Mcbride M.B., Richards B.K., Steenhuis T. (2004). Bioavailability and crop uptake of trace elements in soil columns amended with sewage sludge products. *Plant and Soil*, 262: 71-84.
- Mcclintock T.R., Chen Y., Parvez F., Makarov D.V., Ge W., Islam T., Ahmed A., Rakibuz-Zaman M., Hasan R., Sarwar G., Slavkovich V., Bjurlin M.A., Graziano J.H., Ahsan H. (2014). Association between arsenic exposure from drinking water and hematuria: Results from the health effects of arsenic longitudinal study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 276: 21-27.
- McLaughlin M.J., Tiller K.G., Naidu R., Stevens D.P. (1996). Review: The behavior and environmental impact of contaminants in fertilizers. *Australian Journal of Soil Research*, 34 (1): 1-54.
- McLaughlin M.J., Andrew S.J., Smart M.K., Smolders E. (1998). Effects of sulfate on cadmium uptake by Swiss chard: I. Effects of complexation and calcium competition in nutrient solutions. *Plant and Soil*, 202: 211-216.

- McLaughlin M.J., Parker D.R., Clarke J.M. (1999). Metals and micronutrients - food safety issues. *Field Crops Research*, 60: 143-163.
- Ministry of Environement. (2000a). Lebanon State of the Environment Report (p. 163-179).
- Ministry of Environement. (2000b). Lebanon State of the Environment Report (p. 17-31).
- Mittermüller M., Saatz J., Daus B. (2016). A sequential extraction procedure to evaluate the mobilization behavior of rare earth elements in soils and tailings materials. *Chemosphere*, 147: 155-162.
- Moral R., Gilkes R.J., Jordan, M.M. (2005). Distribution of heavy metals in calcareous and non-calcareous soils in Spain. *Water, Air and Soil Pollution 2*, 162: 127-142.
- Nicholson F.A., Smith S.R., Alloway B.J., Carlton-Smith C., Chambers B.J. (2003). An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of The Total Environment*, 311: 205-219.
- Nogawa K., Yamada Y., Honda R., Ishizak M., Tsuritani I., Kawano S., Kato, T. (1983). The relationship between Itai-itai disease among inhabitants of the Jinzu river basin and cadmium in rice. *Toxicology Letters*, 17: 263-266.
- Nziguheba G., Smolders E. (2008). Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *Science of The Total Environment*, 390: 53-57.
- Ogunleye P.O., Mayaki M.C., Amapu I.Y. (2002). Radioactivity and heavy metal composition of Nigerian phosphate rocks: possible environmental implications. *Journal of Environmental Radioactivity*, 62: 39-48.
- Oliver D.P., Schultz J.E., Tiller K.G., Merry R.H. (1993). The effect of crop rotations and tillage practices on cadmium concentration in wheat grain. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44 (6): 1221-1234.
- Otero N., Vitoria L., Soler A., Canals A. (2005). Fertiliser characterisation: Major, trace and rare earth elements. *Applied Geochemistry*, 20: 1473-1488.
- Pacyna J.M. (1984). Estimation of the atmospheric emissions of trace elements from anthropogenic sources in Europe. *Atmospheric Environment*, 18 (1): 41-50.
- Page A.L., Chang A.C., El-Amamy M. (1987). Cadmium Levels in Soils and Crops in the United States. In *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment* (p. 119-146). California: John Wiley & Sons Ltd.
- Pan J., Yu L. (2011). Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. *Ecological Engineering*, 37: 1889-1894.
- Pengthamkeerati P., Motavalli P.P., Kremer R.J. (2011). Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. *Applied Soil Ecology*, 48: 71-80.

- Pupin B., Freddi O. da S., Nahas E. (2009). Microbial Alterations of the Soil Influenced by Induced Compaction. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, 33: 1207-1213.
- Rajaie M., Karimian N., Maftoun M., Yasrebi J., Assad M.T. (2006). Chemical forms of cadmium in two calcareous soil textural classes as affected by application of cadmium-enriched compost and incubation time. *Geoderma*, 136: 533-541.
- Rao N.K., Hanson J., Dulloo M.E., Ghosh K., Nowell D., Larinde M. (2006). Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes. *Manuels pour les banques de gènes No. 8*. Bioersivity International, Rome. Italie. 166 p.
- Rashad M., Elnaggar E., Assaad F.F. (2014) Readily dispersible clay and its role in the mobility of transition metals Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in an alkaline alluvial soil. *Environmental Earth Science*, 71: 3855-3864.
- Rauret G. (1998). Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta*, 46: 449-455.
- Redon P.-O. *Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (Medicago truncatula)*, 199 p. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I: 2009.
- Reeves R.D., Baker A.J.M. (2000). Metal-accumulating plants. In: *Phytoremediation of toxic metals-using plants to clean up the environment*. Raskin I., Ensley, B.D. (Eds.), John Wiley et Sons, New York, pp. 193-229.
- Renella G., Mench M., Lelie D. Van Der, Pietramellara G., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Nannipieri P. (2004). Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 443-451.
- Rentería-Villalobos M., Vioque I., Mantero J., Manjón G. (2010). Radiological, chemical and morphological characterizations of phosphate rock and phosphogypsum from phosphoric acid factories in SW Spain. *Journal of Hazardous Materials*, 181: 193-203.
- Richards B.K., Steenhuis T.S., Peverly J.H., McBride M.B. (1998). Metal mobility at an old, heavily loaded sludge application site. *Environmental Pollution*, 99: 365-377.
- Rojas-Cifuentes G.A., Johnson B.L., Berti M.T., Norvell W.A. (2012). Zinc fertilization effects on seed cadmium accumulation in oilseed and grain crops grown on North Dakota soils. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72 (1): 117-124.
- Roselli C., Desideri D., Meli M.A. (2009). Radiological characterization of phosphate fertilizers: Comparison between alpha and gamma spectrometry. *Microchemical Journal*, 91: 181-186.
- Rutherford P.M., Dudas M.J., Samek R.A. (1994). Environmental impacts of phosphogypsum. *Science of The Total Environment*, 149: 1-38.

- Sappin-Didier V., Mench M., Gomez A., Masson P. (1997). Evaluation par des extractions sélectives de l'immobilisation du Cd après l'apport de matériaux inorganiques dans deux terres polluées. *Life Sciences*, 320: 413-419.
- Sardans J., Pen J., Ogaya R. (2008). Experimental drought reduced acid and alkaline phosphatase activity and increased organic extractable P in soil in a *Quercus ilex* Mediterranean forest. *European Journal of Soil Biology*, 44: 509-520.
- Sardar K., Qing C., Abd El-latif H., Yue X., Ji-zheng H. (2007). Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 834-840.
- Sauvé S., McBride M., Hendershot W. (1998). Lead Phosphate Solubility in Water and Soil Suspensions. *Environmental Science & Technology*, 32 (3): 388-393.
- Sayyad G., Afyuni M., Mousavi S., Abbaspour K.C., Richards B.K., Schulin R. (2010). Transport of Cd, Cu, Pb and Zn in a calcareous soil under wheat and safflower cultivation-A column study. *Geoderma*, 154: 311-320.
- Schlieker M., Schuring J., Hencke J., Mai H., Schulz H.D. (2001). The influence of advective transport on redox fronts in column experiments and their numeric modeling. Part 2 : modeling of the solid phase and secondary redox reactions. *Environmental Geology*, 41: 17-24.
- Séguin V., Gagnon C., Courchesne F. (2004). Changes in water extractable metals, pH and organic carbon concentrations at the soil-root interface of forested soils. *Plant and Soil*, 260: 1-17.
- Senesi N. (1992). Binding mechanisms of some pesticides to soil humic substances. *Science of the Total Environment*, 123: 63-76.
- Shahack-Gross R., Berna F., Karkanas P., Weiner S. (2004). Bat guano and preservation of archaeological remains in cave sites. *Journal of Archaeological Science*, 31: 1259-1272.
- Sharma S., Kumar V., Tripathi R.B. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1 (2): 90-95.
- Sheng X.-F., Xia J.-J. (2006). Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere*, 64: 1036-1042.
- Singh B.R., Myhr K., Steinnes E. Heavy metals in the Environment. Ed. Edinburgh, J.G. Farmer, 1991. Plant uptake of soil and atmospheric Cd in southern and central Norway Vol. 2., p. 25-28.
- Singh B.R., Myhr K. (1998). Cadmium uptake by barley as affected by Cd sources and pH levels. *Geoderma*, 84: 185-194.
- Sipos P., Németh T., Kovács V., Mohai I. (2008). Sorption of copper, zinc and lead on soil mineral phases. *Chemosphere*, 73: 461-469.

- Sirven J.B. *Détection de métaux lourds dans les sols par spectroscopie d'émission sur plasma induit par laser (LIBS)*, 252 p. Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 1: 2006.
- Sis H., Chander S. (2003). Reagents used in the flotation of phosphate ores: a critical review. *Minerals Engineering*, 16: 577-585.
- Smical A., Hotea V., Oros V., Juhasz J., Pop, E. (2008). Studies on transfer and bioaccumulation of Heavy Metals from soil into lettuce. *Environmental Engineering and Management Journal*, 7 (5): 609-615.
- Sobanska S., Ricq N., Laboudigue A., Guillermo R., Brémard C., Laureyns J., Merlin J-C., Wignacourt J-P. (1999). Microchemical investigations of dust emitted by a lead smelter. *Environmental Science and Technology*, 33: 1334-1339.
- Son J., Lee Y., Kim Y., Eun L.S., Kim J.-G., Hyun S., Cho K. (2011). Soil compaction as a stressor, and its effect on cadmium toxicity to *Paronychiurus kimi* (Collembola). *Applied Soil Ecology*, 47: 204-209.
- Song Y., Wilson M.J., Moon H., Bacon J.R., Bain D.C. (1999). Chemical and mineralogical forms of lead, zinc and cadmium in particle size fractions of some wastes, sediments and soils in Korea. *Applied Geochemistry*, 14: 621-633.
- Sparks D.L. (2005). Toxic metals in the environment: The role of surfaces. *Elements*, 1: 193-197.
- Sposito G. *The chemistry of soils*. 2e éd. Oxford University Press, 2008. Chapitre 1: The Chemical Composition of Soils.
- Sposito G., Schindler P.W. *Speciation of metals in water, sediment and soil systems*. Landner I. Springer Verlag, Berlin, 1986. Reactions at the colloid-soil solution interface, p. 683-699.
- Stephan R. & Bou Jaoude I. *State of trends of the Lebanese environment*, 2010. Chapitre 6: Land Resources, p. 181-227.
- Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution*, 107: 377-389.
- Taylor M.D. (1997). Accumulation of cadmium derived from fertilisers in New Zealand soils. *Science of The Total Environment*, 208: 123-126.
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particule trace metals. *Analytical Chemistry* 51 (7): 844-851.
- Thawornchaisit U., Polprasert C. (2009). Evaluation of phosphate fertilizers for the stabilization of cadmium in highly contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 165: 1109-1113.
- Thicoipé, J.-P. *Laitues*, CTIFL Edition, 1997. 278 p.

- Thien, S.J., Graveel, J.G. (2003). *Laboratory Manual for Soil Science, Agricultural and Environmental Principles*, Preliminary ed., Iowa: Kendall/Hunt publishing company, p. 207.
- Tipping E. (1998). Humic ion-binding model VI: An improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. *Aquatic Geochemistry*, 4, 3-48.
- Tu C., Zheng C.R., Chen H.M. (2000). Effect of applying chemical fertilizers on forms of lead and cadmium in red soil. *Chemosphere*, 41: 133-138.
- Ünver I., Mdenoğlu S., Dilsiz A., Namlı A. (2013). Influence of rainfall and temperature on DTPA extractable nickel content of serpentine soils in Turkey. *Geoderma*, 202-203: 203-2011.
- USAID (2005). *Litani Water Quality Management Project (BAMAS)*. Beirut, Lebanon.
- Uwah E.I., Ndahi N.P., Abdulrahman F.I., Ogugbuaja V.O. (2011). Heavy metal levels in spinach (*Amaranthus caudatus*) and lettuce (*Lactuca sativa*) grown in Maiduguri, Nigeria. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3 (10): 264-271.
- Uysal A., Yilmazel Y.D., Demirer G.N. (2010). The determination of fertilizer quality of the formed struvite from effluent of a sewage sludge anaerobic digester. *Journal of Hazardous Materials*, 181: 248-254.
- Van Der Ent A., Baker A.J.M., Reeves R.D., Pollard A.J., Schat H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil*, 362: 319-334.
- Van Vuuren D.P., Bouwman A.F., Beusen A.H.W. (2010). Phosphorus demand for the 1970 - 2100 period: A scenario analysis of resource depletion. *Global Environmental Change*, 20: 428-439.
- Violante A. (2013). Elucidating mechanisms of competitive sorption at the mineral/Water interface. In *Advances in Agronomy* (Vol. 118, p. 111-176).
- Vochten R.F.C., Geys J.F. (1974). Pyrite and calcite in eptarian concretions from the rupelian clay (oligocene) at rumst (Antwerpen, Belgium) and their geochemical composition. *Chemical Geology*, 14: 123-134.
- Walley C.D. (1997). *The Lithostratigraphy of Lebanon: A Review*. *Lebanese Science Bulletin*, 10 (1): 1-20.
- Wang Y., Shi J., Wang H., Lin Q., Chen X., Chen Y. (2007). The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 75-81.
- Waterlot C., Pruvot C., Ciesielski H., Douay F. (2011). Effects of a phosphorus amendment and the pH of water used for watering on the mobility and phytoavailability of Cd, Pb

- and Zn in highly contaminated kitchen garden soils. *Ecological Engineering*, 37: 1081-1093.
- Wegglar K., McLaughlin J., Graham R.D. (2004). Effects of chloride in soil solution on the plant availability of biosolid-borne cadmium. *Journal of Environmental Quality*, 33: 495-504.
- Weigand H., Bertau M., Hübner W., Bohndick F., Bruckert A. (2013). RecoPhos : Full-scale fertilizer production from sewage sludge ash. *Waste Management*, 33: 540-544.
- Welch R.M., Norvell W.A. (1999). Mechanisms of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. In: *Cadmium in Soils and Plants*, eds. M.J. McLaughlin, B.R. Singh, 125-150, Kluwer Acad. Publ., London.
- Williams C.H., David D.J. (1976). The accumulation in soil of cadmium residues from phosphate fertilizers and their effect on the cadmium content of plants. *Soil Science*, 121 (2): 86-93.
- Xiu-Zhen H., Dong-Mei Z., De-Qian H., Long C., Hai-Lin Z., Hui W. (2009). Heavy Metal Transfer from Soil to Vegetable in Southern Jiangsu Province, China. *Pedosphere*, 19 (3): 305-311.
- Yamaguchi N., Kawasaki A., Iiyama I. (2009). Distribution of uranium in soil components of agricultural fields after long-term application of phosphate fertilizers. *Science of The Total Environment*, 407: 1383-1390.
- Zhang M., Pu J. (2011). Mineral materials as feasible amendments to stabilize heavy metals in polluted urban soils. *Journal of Environmental Sciences*, 23 (4): 607-615.
- Zhao B., Maeda M., Zhang J., Zhu A., Ozaki Y. (2006). Accumulation and Chemical Fractionation of Heavy Metals in Andisols After a Different , 6-year Fertilization Management. *Environmental Science and Pollution Research*, 13 (2): 90-97.
- Zhi-xin N., Li-na S., Tie-heng S., Yu-shuang L., Hong W. (2007). Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 961-967.
- Zhi-xin Y., Shu-qing L., Da-wei Z., Sheng-dong F. (2006). Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences*, 18 (6): 1135-1141.

Annexes

Annexe 1 : Caractérisation du sol non fertilisé

Caractères globaux du sol

En projetant les valeurs de l'argile, sable et limon des différentes strates du sol collecté à Ammik (chapitre II) sur le diagramme ternaire de texture, on remarque que le sol est argileux avec des pourcentages en argile allant entre 55,4 et 73,1%, en sable entre 14,4 et 24,7% et en limon entre 12,5 et 19,9% (**Figure 1**). Les résultats des différentes strates du sol ont montré une augmentation de la teneur en argile et une diminution de celle du sable et du limon avec la profondeur. Cela est attendu en absence de labour du sol (vierge) et où l'infiltration de l'eau transporte les particules fines en profondeur.

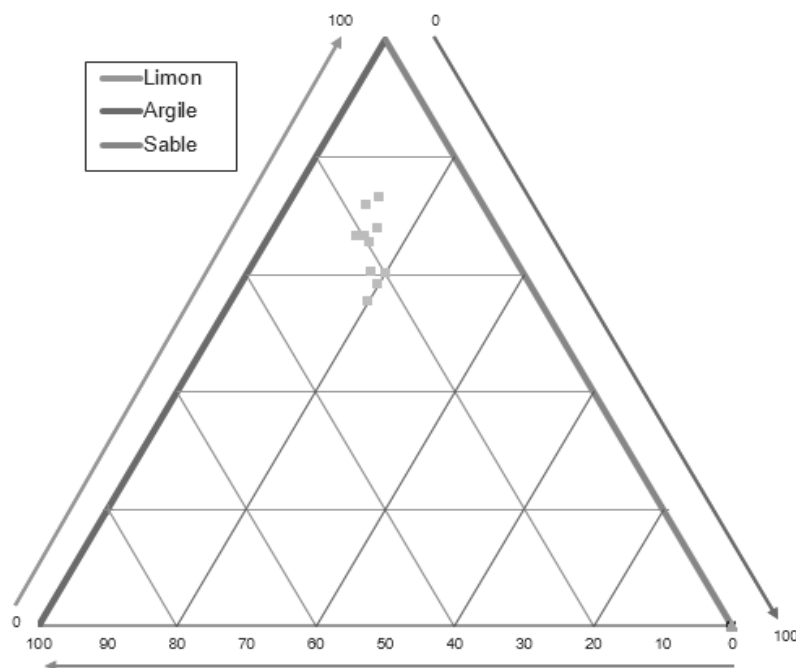


Figure 1 Triangle de texture dans chaque strate du sol.

La matière organique avait le même comportement que le sable et le limon, elle diminuait tout au long du profil du sol. La CEC est plutôt proportionnelle à la teneur en argile dans le sol (**Tableau 1**). En prenant en considération la profondeur, le **Tableau 2** de corrélation de Pearson (n-1) a montré une corrélation positive entre le sable et le limon (0,71), une corrélation négative entre l'argile et le sable (-0,91) et l'argile et le limon (-0,93) ce qui est en accord avec les études d'Hubert (2009) qui a trouvé une augmentation de l'argile en allant en profondeur et une diminution du limon et du sable en augmentant la profondeur dans des sols de type Cambisol. La CEC et l'argile sont corrélés positivement (0,88).

Tableau 1 Matière organique, C.T., CEC, pH, EC et TDS dans chaque strate de la carotte de sol.

Profondeur (cm)	Matière organique %	C.T	CEC (cmol+/kg)	pH	EC (μ S/cm)	TDS (mg/L)
0-5	4,49 \pm 0,13 ^a	0,25 \pm 0,03 ^e	21,7 \pm 0,4 ^e	7,96 \pm 0,06 ^{ab}	489,8 \pm 2,1 ^h	52,6 \pm 0,6 ^f
5-10	3,9 \pm 0,12 ^b	0,44 \pm 0,03 ^e	21,6 \pm 0,09 ^e	7,86 \pm 0,06 ^{abcd}	416,08 \pm 2 ⁱ	44,6 \pm 1 ^g
10-15	3,15 \pm 0,01 ^c	0,39 \pm 0,02 ^e	22,3 \pm 0,1 ^e	7,9 \pm 0,1 ^{abc}	636 \pm 8 ^g	69 \pm 3,2 ^e
15-20	3 \pm 0,06 ^c	0,69 \pm 0,04 ^d	25,4 \pm 0,2 ^{cd}	8,2 \pm 0,1 ^a	1021 \pm 3,1 ^e	113,7 \pm 3,2 ^c
20-25	1,9 \pm 0,17 ^{fg}	1,3 \pm 0,2 ^c	25 \pm 0,65 ^d	7,56 \pm 0,3 ^{cd}	1028 \pm 6,4 ^e	115,3 \pm 2,5 ^c
25-30	2 \pm 0,16 ^{ef}	1,63 \pm 0,04 ^{ab}	26,1 \pm 0,1 ^{bc}	7,7 \pm 0,1 ^{bcd}	1136 \pm 2,9 ^b	121,7 \pm 1,5 ^{ab}
30-40	2,4 \pm 0,06 ^d	1,42 \pm 0,03 ^c	24,95 \pm 0,5 ^d	7,77 \pm 0,15 ^{bcd}	915 \pm 4,2 ^f	96,7 \pm 1,5 ^d
40-50	2,3 \pm 0,006 ^{de}	1,71 \pm 0,03 ^a	25,5 \pm 0,2 ^{cd}	7,8 \pm 0,1 ^{bcd}	1108 \pm 3,2 ^c	117,7 \pm 1,1 ^{abc}
50-60	1,7 \pm 0,05 ^g	1,48 \pm 0,05 ^{bc}	26,9 \pm 0,5 ^b	7,5 \pm 0,1 ^d	1162 \pm 1,9 ^a	122,3 \pm 0,6 ^a
60-80	1,2 \pm 0,01 ^h	1,43 \pm 0,08 ^c	30,2 \pm 0,04 ^a	7,96 \pm 0,06 ^{ab}	1090,2 \pm 3,6 ^d	116,7 \pm 1,5 ^{bc}

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour un même paramètre ne représentent pas de différence significative

Une teneur élevée en matière organique conduit à un rapport sites disponibles/échangeables important permettant ainsi l'échange de protons avec les particules du sol (Kanbar et al. 2014). En effet, la matière organique est sensible aux mécanismes association-dissociation des ETM et elle décroît en profondeur où une diminution de l'adsorption des ETM sur les composés organiques (Greenwood and Kendall 1999). Kanbar et al. 2014 ont trouvé une corrélation négative entre la charge des particules et la teneur en argile ce qui est en accord avec nos résultats où l'argile est inversement proportionnelle à la charge des particules (matrice de Pearson (n-1) (-0,6565)) (**Tableau 2**).

Le pH, dans les différentes strates du sol, varie entre 7,5 et 8,2 avec une valeur moyenne de $7,82 \pm 0,23$. La variation du pH en allant en profondeur n'est pas importante sauf la diminution entre les profondeurs 15-20 et 20-25 cm et son augmentation entre les profondeurs 50-60 et 60-80 cm (**Tableau 1**). Ce pH basique est caractéristique des sols libanais alcalins. Dans notre étude, on a trouvé une corrélation positive entre le pH et le limon (0,52).

La conductivité variait entre 414 et 1163 μ S/cm et le TDS entre 44 et 1223 mg/L et augmentaient ensemble en fonction de la profondeur. Le sable génère une faible conductivité, le limon une conductivité moyenne alors que l'argile une conductivité élevée.

Tableau 2 Matrice de Pearson (n-1).

Variables	C.T./100	CEC	EC*10	TDS	MO/10	Sable	Limons	Argile	pH/10	Zeta	Taille*10
C.T./100	1										
CEC	0.7425	1									
EC*10	0.8710	0.8432	1								
TDS	0.8445	0.8332	0.9952	1							
MO/10	-0.8606	-0.8880	-0.8766	-0.8666	1						
Sable	-0.6922	-0.8237	-0.7066	-0.6723	0.7899	1					
Limons	-0.8712	-0.8158	-0.8448	-0.8296	0.9053	0.7061	1				
Argile	0.8521	0.8869	0.8440	0.8178	-0.9211	-0.9135	-0.9330	1			
pH/10	-0.4933	-0.1360	-0.2986	-0.2878	0.4024	0.2141	0.5227	-0.4088	1		
Zeta	0.3985	0.4652	0.5135	0.5260	-0.6565	-0.4515	-0.4405	0.4819	-0.1948	1	
Taille*10	-0.1079	-0.3110	-0.0495	-0.0522	0.2208	0.2565	0.4401	-0.3836	0.0471	0.0415	1

Ainsi, l'augmentation de la CEC et du TDS et la CEC révèle bien une teneur en argile plus élevée en profondeur. Le sol étudié est un sol pauvre en calcaire total (C.T). Ce dernier varie entre 0,22 et 1,74% avec une moyenne égale à $1,08 \pm 0,55$ (**Tableau 1**). La matrice de Pearson (n-1) montre une corrélation positive entre le C.T et la CEC, la conductivité, le TDS et l'argile ainsi qu'une corrélation négative entre le C.T et la MO, le sable et le limon. Les paramètres étudiés peuvent être divisés en deux catégories suivant les corrélations obtenues. D'une part, le groupe limon, sable, matière organique et d'une part le TDS, conductivité, C.T, CEC, argile et charge des particules. L'augmentation du TDS et de la conductivité est liée également au lessivage répété du sol et à la migration des sels dissous vers les couches profondes du sol. Dans la présente étude où le sol étudié est alcalin et où règne le climat semi-aride, la CEC a augmenté d'environ 30% en passant de la surface vers la couche la plus profonde de la carotte sans toutefois donner un changement considérable de pH. Cependant, Chaignon (2001) a mentionné que plus le pH est élevé, plus la CEC augmente et la quantité de cations absorbée augmente.

L'écart interquartile (E.IQ) pour le pH, l'EC, le TDS et le CT montre une dispersion modérée de ces paramètres au sein de chaque strate puisque les changements des valeurs sont inférieurs à 30% (**Tableau 3**).

Tableau 3 E.IQ (%) du pH, EC, TDS et calcaire total dans chaque strate de la carotte de sol avec leur E.IQ.

Profondeur (cm)	E.IQ (%)			
	pH	EC	TDS	C.T
0-5	0,06	4,44	0,94	0,13
5-10	0,06	4,9	2,3	0,07
10-15	0,13	12,39	4,4	0,05
15-20	0,12	3	2,6	0,06
20-25	0,4	6,3	2,2	0,12
25-30	0,13	2,4	1,2	0,03
30-40	0,2	4,6	1,5	0,02
40-50	0,13	2,7	0,8	0,01
50-60	0,13	1,6	0,4	0,03
60-80	0,06	2,9	1,3	0,05

Charge et taille des particules du sol

L'ensemble des résultats du potentiel Zeta et la taille des particules du sol sont présentés dans le **Tableau 4**. La stabilité des particules colloïdales du sol est indiquée par le potentiel zêta et varie entre -47 et -90 mV. La plus petite valeur du PZ des particules est observée dans la couche superficielle (0-5 cm) révélant une stabilité d'interaction inter-particulaire probablement liée à l'abondance de la matière organique et de l'argile selon la profondeur des strates. Dans la matrice de Pearson (n-1) (**Tableau 2**), le PZ était en corrélation positive avec la CEC et la conductivité électrique; plus la profondeur augmente plus le PZ, l'argile, la CEC, le TDS et la conductivité, augmentent. Ainsi, une agrégation de particules d'argiles et du limon devrait se produire dans ces conditions.

Tableau 4 Potentiel Zeta (mV) et taille des particules obtenues de chaque strate de sol non fertilisé (S2).

Strates de sol (cm)	Potentiel Zeta (mV)	Taille maximale (μm)
0-5	-90,6 \pm 0,2	394
5-10	-61,8 \pm 0,1	517
10-15	-47,77 \pm 0,26	592
15-20	-55,267 \pm 0,25	517
20-25	-48,8 \pm 0,1	344
25-30	-66,77 \pm 0,06	676
30-40	-66,27 \pm 0,09	344
40-50	-49,1 \pm 0,1	517
50-60	-49,6	450
60-80	-49,7	301
Minimum	-90,8	2
Maximum	-47,5	676
Médiane	-52,35	484
EIQr %	0,19	0,39
Moyenne	-58,57	465,23
Écart-type (n-1)	13	11,59

Cette agrégation est mise en évidence par l'analyse de la distribution granulométrique. Ainsi, la distribution des tailles des particules varie entre 2 et 676 μm . Elle indique une granulométrie hétérogène. Les strates 0-5, 20-25, 30-40 et 60-80 cm ont les diamètres moyens des particules variables entre 2 et 350 μm , alors que le diamètre des particules dans les strates restantes varie entre 2 et 500 μm avec la plus grande taille atteinte d'environ 676 μm dans la strate 25-30 cm. La corrélation positive d'une part entre la taille des particules et l'abondance du sable et

négative d'une autre part entre la taille des particules et l'argile sont observées dans la matrice de Pearson (n-1) (**Tableau 2**).

Les métaux dans le sol non fertilisé

Le **Tableau 5** montre les teneurs des métaux dans le sol non fertilisé.

Tableau 5 Teneur en métaux dans le sol non fertilisé.

Métaux (mg/Kg)	Fe	Zn	Pb	Cd	Ca
Moyenne \pm écart-type	55037 \pm 11964	363 \pm 18	29,5 \pm 3,5	1,8 \pm 0,3	1657 \pm 780
Min	46960	334	24,7	1,28	803
Max	89000	391	34,1	2,22	3334

Les teneurs en Pb sont inférieures à celles élaborées par le CEQCs et présentées dans la section § I.2.3 du chapitre I (**Tableau 7**-page 21) tandis que les teneurs en zinc, élément nutritif aux plantes, sont supérieures aux réglementations canadiennes (CEQCs). Le cadmium obtenu est supérieur aux normes canadiennes pour le sol agricole (1,4 mg Cd/Kg) mais le Pb est inférieur à la norme pointée à 70 mg Pb/Kg (USAID 2005). L'analyse des composants principaux (ACP) des différents métaux analysés montre des corrélations positives entre ces métaux à l'exception du Ca qui a été corrélé négativement avec le Pb (-0,83) et le Cd (-0,66) mais le Cd est bien corrélé positivement au Pb (0,8) et au Fe (0,62) (**Tableau 6**).

Tableau 6 Tableau de corrélation des différents métaux selon Pearson (n-1).

Variables	Fe*1000	Pb	Cd/10	Zn*10	Ca*10
Fe*1000	1				
Pb	0.4965	1			
Cd/10	0.6161	0.8037	1		
Zn*10	0.4425	0.1559	0.3133	1	
Ca*10	-0.4074	-0.8316	-0.6620	-0.4374	1

Pour cela il a fallu réaliser l'analyse des variances (ANOVA) du Cd, Fe, Pb et Zn ensemble et le Ca seul en fonction de la profondeur pour voir si la mobilité de ces métaux est significative en passant à travers les différentes strates du sol. Les valeurs moyennes des métaux dans chaque strates été regroupées dans le **Tableau 7** qui montre la diminution des concentrations du Fe, Pb, Cd, Zn et Ca en allant de la surface vers la profondeur.

Tableau 7 Moyennes des métaux étudiés dans chaque strate.

Profondeur (cm)	Fe	Pb	Cd	Zn	Ca
	(mg/Kg)				
0-5	88986 ± 11,5 ^a	34 ± 0,006 ^a	2,22 ± 0,002 ^a	389,8 ± 0,2 ^b	835 ± 0,1 ⁱ
5-10	49040 ± 36 ^g	32 ± 0,006 ^c	1,96 ± 0,01 ^c	373,6 ± 0,01 ^c	803 ± 0,15 ^j
10-15	46980 ± 20 ^h	33 ^b	1,88 ± 0,002 ^e	361,8 ± 0,04 ^d	1016 ± 0,06 ^h
15-20	55940 ± 53 ^c	33,2 ± 0,15 ^b	1,94 ± 0,002 ^d	353,8 ± 0,05 ^f	1069 ^g
20-25	57887 ± 15,3 ^b	31,5 ± 0,57 ^c	2 ± 0,01 ^b	345 ± 0,05 ^h	1284 ± 0,15 ^f
25-30	50780 ± 20 ^e	28 ± 0,02 ^d	1,81 ± 0,001 ^f	359,4 ± 0,54 ^e	1948 ± 0,15 ^d
30-40	52807 ± 11,5 ^d	25,4 ± 0,57 ^f	1,81 ± 0,009 ^f	391 ± 0,015 ^a	1824 ± 0,06 ^e
40-50	49337 ± 11,5 ^f	26,2 ± 0,025 ^e	1,7 ± 0,001 ^g	334 ± 0,03 ⁱ	3334 ± 0,1 ^a
50-60	49293 ± 5,8 ^f	26,4 ± 0,025 ^e	1,42 ± 0,001 ^h	374 ± 0,2 ^c	2409 ± 0,1 ^b
60-80	49323 ± 15,3 ^f	25,2 ± 0,006 ^f	1,28 ± 0,002 ⁱ	347,5 ± 0,3 ^g	2051 ± 0,1 ^c

Les valeurs ayant les mêmes lettres pour un même paramètre ne représentent pas de différence significative selon Tukeys' et Duncan

Suivant l'analyse des données ANOVA selon le test de Duncan et de Tukeys' au seuil de signification $\alpha = 0,05$, pour les différents métaux dans les strates du sol, une différence significative est observée entre toutes les profondeurs sauf pour les teneurs en Fe dans les strates 40-50, 50-60 et 60-80 cm qui sont comparables.

La mobilité des métaux dépend de leur spéciation. Cette dernière est en relation avec le pH, la CEC, la présence d'argile, de matière organique et des oxydes (Chuan et al. 1996, McBride et al. 2004, Moral et al. 2005, Chen et al. 2006, Rajaie et al. 2006, Grant et al. 2010).

Le fer et le calcium sont les deux éléments majeurs ayant les plus grandes teneurs. Parmi les métaux étudiés, la teneur en calcium augmente progressivement en allant en profondeur de façon significative. Il est évident que le calcium augmente avec l'augmentation du calcaire total avec la profondeur (**Tableau 3**, **Tableau 7**) et en s'approchant de la roche mère qui est la plus riche en calcaire. L'augmentation de la concentration du calcium peut être liée à la diminution de la compétition avec le Fe et cela est prouvé par la corrélation négative trouvée entre le Ca et le Fe et ayant tous les deux les teneurs les plus élevées. Cependant, la teneur des autres métaux diminue en allant en profondeur avec une différence significative. On observe une diminution de 42, 26, 11 et 44% de la teneur de cadmium, plomb, zinc et fer respectivement entre la superficie (0-5 cm) et la strate la plus profonde (60-80 cm) (**Tableau 7**). Le pH du sol est basique en surface donc on s'attend à avoir une immobilisation des métaux à la surface (Emmerich et al. 1982; Camobreco et al. 1996; Rashad et al. 2014), mais dans le sol étudié, la teneur en MO n'est pas nulle et peut former des complexes solubles avec les métaux surtout

avec le Pb qui peut migrer en profondeur (Sauvé et al. 1998, Sterckeman et al. 2000, Kashem and Singh 2001). Le zinc est un élément mobile dans le sol et entre en compétition avec le cadmium et le plomb ayant le même rayon ionique ($Zn^{2+} = 0,074$ nm, $Cd^{2+} = 0,097$ nm, $Pb^{2+} = 0,119$ nm) (Rojas-Cifuentes et al. 2012).

Le cadmium diminue en profondeur et la teneur la plus élevée est enregistrée à la surface (2,22 mg/Kg). Comme c'est un sol vierge non traité antérieurement par des fertilisants chimiques, l'origine probable de ce métal pourra être les dépôts atmosphériques comme celle du Pb (Denaix 2007, Luo et al. 2009). La capacité du sol à retenir les métaux est aussi liée à la présence des oxydes de fer et d'aluminium donc la présence des Pb, Zn et Cd en grandes quantités dans la strate 0-5 cm est liées à la quantité élevée du fer dans cette strate (**Tableau 7**) et à la présence de kaolinite, quartz, microcline, calcite et d'albite trouvés dans l'analyse minéralogique effectuée sur le sol. Mais sous des conditions arides comme c'est le cas à Ammik, des altérations physiques sont favorisées d'où une dissolution des oxydes de Fe et Mn présents dans le sol et une solubilisation des métaux associés tels que le Cd et le Pb (Davranche and Bollinger 2000, Kabata-Pendias 2011).

Effect of Cadmium on *Lactuca sativa* Grown in Hydroponic Culture Enriched with Phosphate Fertilizer

Valérie S. Azzi^{1,2,3*}, Ali Kanso¹, Ahmad Kobeissi¹, Véronique Kazpard¹, Bruno Lartiges², Antoine El Samrani¹

¹Platform for Research and Analysis in Environmental Sciences, Doctoral School of Sciences and Technology (EDST), Faculty of Science, Lebanese University, Hadat, Lebanon

²Geosciences Environment Toulouse, University of Toulouse III, Toulouse, France

³Lebanese Agriculture Research Institute, Fanar, Lebanon

Email: valerie.azzi@hotmail.com, antoineelsamrani@ul.edu.lb

Received 7 October 2015; accepted 28 November 2015; published 3 December 2015

Copyright © 2015 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Cadmium (Cd), one of the most toxic heavy metals added to soil after phosphate fertilizer treatment, was investigated. The effects of this metal on morphological and physiological changes of *Lactuca sativa* were studied in addition to its partitioning in different parts of the crop. In parallel, *Lactuca sativa* was allowed to grow under hydroponic conditions with modifications of the Hoagland nutrient solution. This solution was submitted to five Cd concentrations, 0, 0.093, 0.186, 0.279 and 0.372 mg Cd/L and three P concentrations, 0, 299 and 1420 mg P/L. The study showed a positive effect of phosphorus on root elongation, surface area while cadmium inhibited plant growth and sometimes the death of the plants. Cadmium was found to be accumulated in roots while zinc was preferably accumulated in the leaves and stems. The increase of performance of *Lactuca sativa* under hydroponic condition and Hoagland contaminated solution with cadmium was found to be better than the ones grown in Cd amended soil with or without phosphorus.

Keywords

Cadmium, Fertilizers, Hydroponic, *Lactuca sativa*, Phosphorus

1. Introduction

Cadmium (Cd) naturally occurs at trace levels in the environment but tends to accumulate abundantly in soils.

*Corresponding author.

How to cite this paper: Azzi, V.S., Kanso, A., Kobeissi, A., Kazpard, V., Lartiges, B. and El Samrani, A. (2015) Effect of Cadmium on *Lactuca sativa* Grown in Hydroponic Culture Enriched with Phosphate Fertilizer. *Journal of Environmental Protection*, 6, 1337-1346. <http://dx.doi.org/10.4236/jep.2015.612116>

Accumulation is due to agricultural practices such as the application of phosphate fertilizers, use of wastewater for irrigation, and application of biosolids and composts from urban wastes [1]-[3]. It is considered as a potentially phytotoxic element due to its high toxicity and solubility in water [4]. Most general symptoms of Cd toxicity in plants are stunted growth, chlorosis, necrotic lesions, wilting and disturbances in mineral nutrition and carbohydrate metabolism. It strongly reduces biomass production and even conducts to integral plant death [4]-[6]. Cadmium has been shown to interfere with uptake, transport, and use of several nutrient elements and water by plants. It can suppress iron uptake by plants, induces P deficiency and reduces manganese transport to the plant [6]-[8]. It is readily absorbed by plant roots which are at the base of the food chain where it becomes very toxic to both plants and animals [9] [10].

Among cultivated plant species, *Lactuca sativa* (lettuce) is a worldwide important crop and one of the most consumed leafy vegetables in the human dietary [6] [11]. It is rich mainly in vitamins A and C and minerals such as iron and phosphorus [12]. In 2010, the world production of lettuce was approximately 24 million metric tons, with a cultivation area of 1 million hectares [13] [14]. This crop is known for its comparatively high accumulation of cadmium in leaves [9]. In this perspective, *Lactuca sativa* species has been designated for studying the impact of diets based on food crops cultivated on cadmium contaminated soils on human health [9]. It is chosen as a monitoring tool for the evaluation of the environmental contamination of Ni and Cd especially that EPA and the Organization for Economic Cooperation and Development have recommended this crop a key specie [14].

Nevertheless, since most of this crop is usually grown in greenhouses, with the application of special substrates and fertilization practices including water reuse, it is associated with the risk of increasing heavy metals concentration [6] [8]. Studies aiming to improve and understand cadmium toxicity in plant metabolism have been done on hydroponic cultures due to their easiness and suitability [15]. Hydroponic culture was used also to evaluate phytoextraction of cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard [16].

Hydroponics have several advantages including the possibility of using areas unsuitable for conventional farming, such as arid and degraded soils, independence of the crop to weather conditions leading to its cultivation all over the year [17], and reduction in the use of labor-intensive activities such as weeding and soil preparation. This technique allowed a reduction in the plant cycle (45 - 60 days), leading to an anticipated harvest; moreover, it enabled an active crop rotation, improved financial returns, and an efficient use of cultivation resources specially water and nutrients, while maintaining great environmental benefit.

Hydroponic systems weren't only associated to an increase in production yields, but also to a reduction in the overall production costs by enabling better control and standardization of the production process [13] [17]. In hydroponic crops, absorption is usually proportional to the concentration of nutrients in the solution near the roots influenced by the salinity, oxygenation, temperature and pH of the nutrient solution [13]. In soil, cadmium uptake is conditioned by its concentration in the soil and its bioavailability influenced by the presence of organic matter and clay, pH, redox potential, temperature and concentrations of other elements [6].

In this context, lettuce has been selected due to several special features that aren't restricted to its high accumulation of cadmium in leaves, but also involving its capability of growing easily in hydroponic systems, which permit the control of the tissue metal concentration [18]. Studies emphasized on the impact of cadmium on the growth of lettuce plants, as well as on the absorption process of cadmium at the level of the roots, in addition to the distribution of cadmium through different organs [9].

To grow, plants, in soil or in hydroponic culture, need micronutrients and macronutrients. In the hydroponic culture, these nutrients were found in the Hoagland solution which was developed by D. R. Hoagland and D. I. Arnon in 1933 and was appropriate for the growth of large variety of plant species.

In order to understand the fundamental processes happening during the experiments, morphological and physiological characteristics, cadmium distribution in different parts of *Lactuca sativa* grown in hydroponic culture were investigated under five Cd concentrations, 0, 0.093, 0.186, 0.279 and 0.372 mg Cd/L and three P concentrations, 0, 299 and 1420 mg P/L.

2. Experimental Section

2.1. Hydroponic Support Cylinders

Forty-five bins of 1150 mL volume each framed with black film were used for lettuces growth to prevent algal growth. 90 identical disks from rigid Styrofoam sheets were cut and measured to fit into the opening of the bins;

45 disks were made from 1 cm thick sheets and 45 from 2 cm. All disks were then perforated in two areas; one 2 cm hole in the middle of the disks and a 0.5 cm hole on a random area of the disk. Straws were pushed through this second hole and reach the bottom of the bin to aerate the system. Every 1 cm thick disk was then glued to a 2 cm thick disk, with an inert 5 mm net in between them, using regular white adhesive. The inert film acted as the support system for the lettuce plants, through which the roots of the plants pass to reach the nutrient solution underneath. Finally, the bins were randomly placed in a greenhouse of controlled temperature between 20°C and 23°C as the ideal temperature for lettuce development is 23°C [12], exposed to sunlight and artificially lit with numerous fluorescent lamps 24 hours a day, every day.

2.2. *Lactuca sativa* Plants and Growth Conditions

Forty five lettuce plants were grown on peat for 15 days; they were afterwards removed and rinsed by tap water to remove all remaining peat particles off the roots. The fifteen-day-old plantlets were then transferred to hydroponic conditions, with 45 plantlets grown in 1150 mL of aerated nutrient solution. The nutrient solution or Hoagland solution contained 6.0662×10^2 mg/L KNO_3 , 9.44 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 4.92 mg/L MgSO_4 , 2.86×10^{-3} mg/L H_3BO_3 , 1.18×10^{-3} mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.22×10^{-3} mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.08×10^{-3} mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.02×10^{-3} mg/L $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.61×10^3 mg/L EDTA, 1.9×10^3 mg/L KOH and 2.49×10^3 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

To study the effect of cadmium and phosphorus on the plant morphology, accumulation and transfer of cadmium into the lettuces, different concentrations of cadmium prepared from $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99.99 %; Sigma-Aldrich) and phosphorus prepared from simple superphosphate fertilizer (18% P_2O_5) were added to the nutrient solution to complete the volume of bins to 1.15 L as showed in **Table 1**. Each treatment was triplicated. Metals identified in superphosphate fertilizer were very low; Pb, Cd, Zn and Cu were respectively 10 ± 0.2 ; 5.1 ± 0.8 ; 92.26 ± 12 and 6 ± 0.5 mg/Kg of fertilizer which are very low contents considering the fertilizer added quantity.

The Hoagland solution without P and Cd were used as control samples. Nutrient solutions were changed twice a week over the course of the entire experiment.

At the eighth week, the lettuces were harvested. Leaf numbers were counted, plants height, roots length, shoots and roots fresh mass (FW_S and FW_R respectively) and fresh leaves surface areas were measured. After these measurements, roots, stems and leaves were dried at 80°C for 48 hours in ventilated oven, and then dry mass of each part was determined (DW_R , DW_S and DW_L for roots, stems and leaves dry weight respectively). Dry weight of the areal part (DWA_P) was also measured.

Table 1. Hydroponic treatments.

Treatments	Element concentrations	
	P_2O_5 (mg/L)	Cd (mg/L)
P0Cd0		Cd0 = 0
P0Cd1		Cd1 = 0.093
P0Cd2	P0 = 0	Cd2 = 0.186
P0Cd3		Cd3 = 0.279
P0Cd4		Cd4 = 0.372
P1Cd0		Cd0 = 0
P1Cd1		Cd1 = 0.093
P1Cd2	P1 = 686	Cd2 = 0.186
P1Cd3		Cd3 = 0.279
P1Cd4		Cd4 = 0.372
P2Cd0		Cd0 = 0
P2Cd1		Cd1 = 0.093
P2Cd2	P2 = 3250	Cd2 = 0.186
P2Cd3		Cd3 = 0.279
P2Cd4		Cd4 = 0.372

The dried samples were homogenized by grinding using a stainless steel blender. A sample mass between 50 and 1000 mg of each plant parts were digested in 20 mL HNO_3 (14 M, Merck). Finally, cadmium in the leaves, stems and roots of lettuces were analyzed using furnace atomic absorption spectrophotometer (AAS) (Rayleigh WFX-210 AA spectrophotometer).

All the data reported represent an average of three replicates with standard deviation. XLSTAT software (Version 2014.5.03) was used to treat the data. One-way ANOVA was used to detect treatment effects, Duncan's test was used to determine significant differences between treatment means and Principal Component Analysis (PCA), Pearson ($n - 1$) type was used to detect the correlations between the parameters. All statistical tests are used with an acceptable error margin of 5%.

3. Results and Discussion

3.1. Aerial Part of *Lactuca sativa* Grown under Cadmium Treatments

In order to analyze the effects of cadmium on lettuce growth, plants length and number of leaves were determined during the 8 weeks of culture in the hydroponic systems. Plants submitted to high cadmium concentration or none P concentration were dead and some of its exhibited symptoms of necrosis (Figure 1).

Lettuces lengths increased by 45% between treatments with P and Cd (P0Cd0) and treatments with P and without Cd (P1Cd0, P2Cd0). This increase was only observed in treatments without Cd where the plants lengths decreased with increasing Cd concentrations (Table 2). Cadmium displayed a negative effect on lettuce growth where cadmium inside plant tissues can inhibit the photosynthesis by inhibiting chlorophyll and photosystem II together responsible of the photochemical efficiency of the plants [9] [11].

Leaves number and surface area decreased in all the treatments in a non-significant way with cadmium increase except in the treatments where P is at its highest concentration in the nutrient solution (P2) (Table 2).

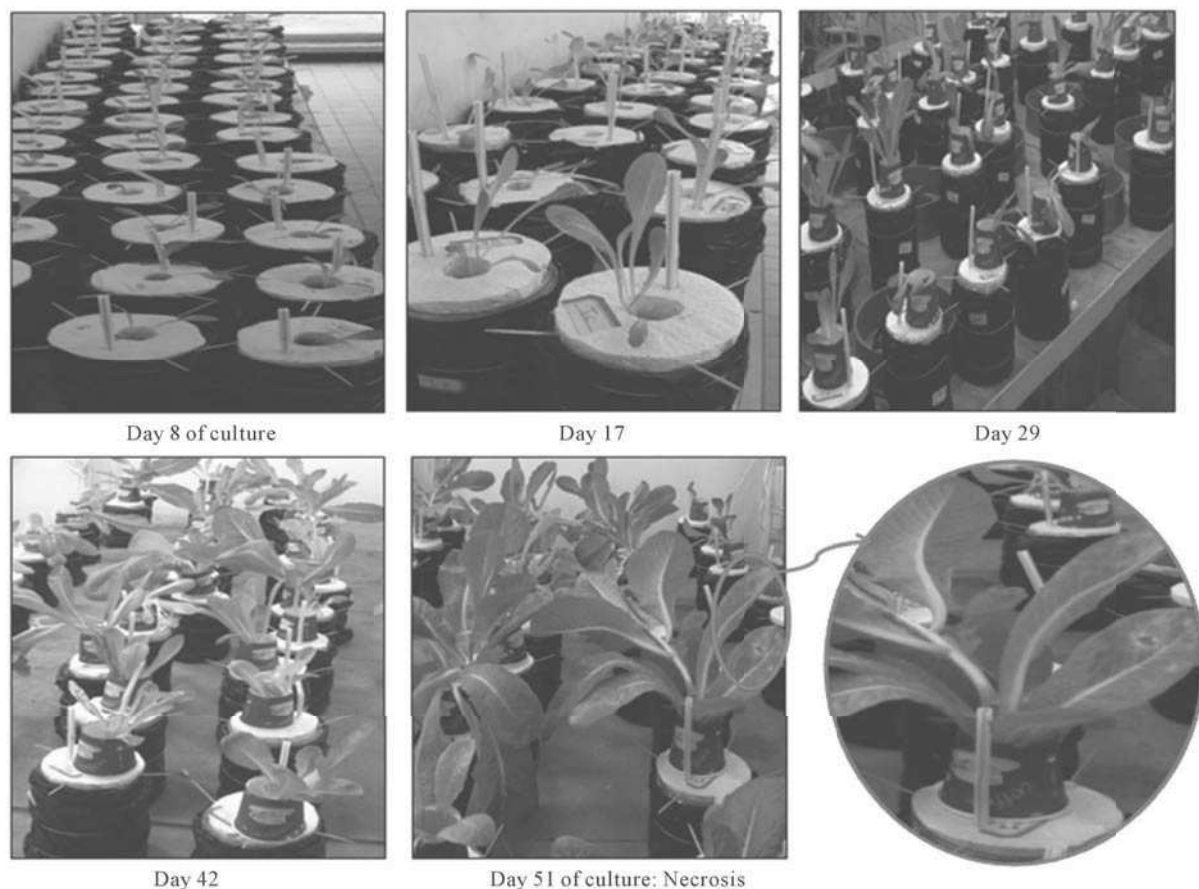


Figure 1. Evolution of the aerial part of *Lactuca sativa*.

Table 2. Lettuces length, leaves numbers and surface area of lettuces under different treatments.

Treatments		Parameters		
		Length (cm)	Leaves number	Surface area (cm ²)
Phosphate P0	Cadmium Cd0	22 ± 3.8 ^{ab}	9 ^{ab}	116 ± 42.2 ^a
	Cd1	23 ± 4.4 ^{ab}	9 ± 0.9 ^{ab}	103 ± 1.9 ^a
	Cd2	22 ± 2.3 ^{ab}	10 ± 0.5 ^{ab}	109 ± 14.3 ^a
	Cd3	24 ± 0.2 ^{abc}	9 ± 0.5 ^{ab}	48 ± 5 ^a
	Cd4	20 ± 1.5 ^a	8 ^a	57 ± 8.1 ^a
P1	Cd0	40 ± 5.1 ^c	13 ± 2.2 ^b	532 ± 99.4 ^c
	Cd1	36 ± 3.4 ^{dc}	11 ± 1 ^{ab}	412 ± 98.2 ^{bc}
	Cd2	30 ± 5.5 ^{bcd}	11 ± 1 ^{ab}	244 ± 113.7 ^{ab}
	Cd3	33 ± 0.1 ^{cde}	12 ± 0.5 ^{ab}	204 ± 41 ^{ab}
	Cd4	27 ± 1.2 ^{abc}	9 ± 0.5 ^{ab}	145 ± 17.4 ^a
P2	Cd0	40 ± 0.1 ^c	20 ± 2.5 ^c	986 ± 131.7 ^d
	Cd1	30 ± 3.1 ^{bcd}	20 ± 3.5 ^c	976 ± 152.2 ^d
	Cd2	28 ± 0.2 ^{abcd}	13 ± 1.5 ^{ab}	303 ± 2.5 ^{abc}
	Cd3	26 ± 1.2 ^{abc}	12 ± 1.5 ^{ab}	227 ± 61.5 ^{ab}
	Cd4	28 ± 1.1 ^{abcd}	12 ± 1.5 ^{ab}	230 ± 29.2 ^{ab}

Means within columns followed by the same letters do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ($\alpha = 0.05$).

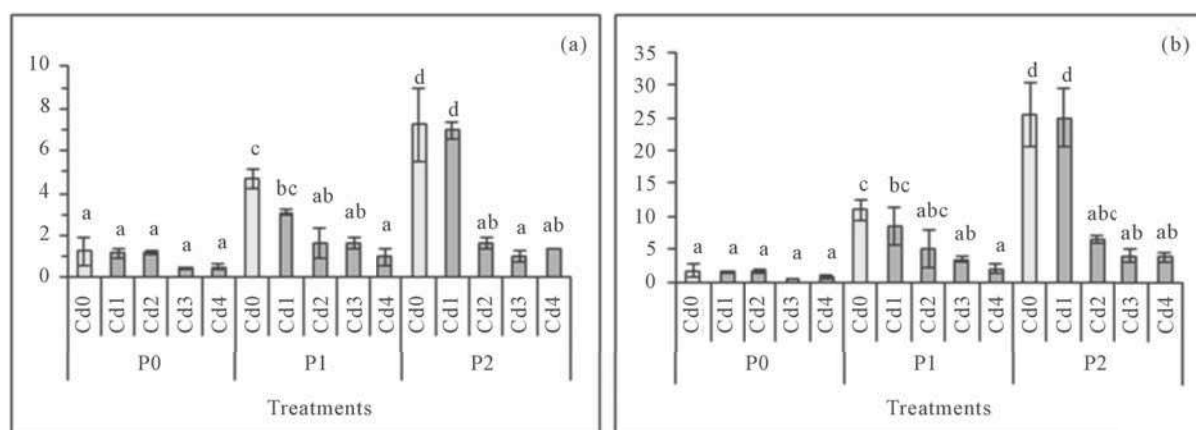
Increased leaves number and surface area were observed when P concentration was increased. For example, leaves number reached an augmentation of 45% between P1Cd1 and P2Cd1, the surface area increased by 78% and 88% between P0-P1 and P0-P2 respectively and the lowest leaves number and surface area occurred in P0 due to the stress effect of the lettuces resulted from the absence of an important macro element (Table 2). At high cadmium level (Cd2 to Cd4), this metal had decreased lettuces productivity but at lower level (P0Cd0 and P0Cd1) where cadmium had stimulated productivity. For the leaves surface area, the phosphorus level played an important role. At low P concentration and in increasing Cd levels in the nutrient solution, leaf area decreased by 54%, 61% and 73% when comparing P1Cd2, P1Cd3 and P1Cd4 to P1Cd0 respectively. At higher P treatment (P2), a significant decrease by 73% of surface area was observed between P2Cd0 or P2Cd1 and P2Cd2, P2Cd3 and P2Cd4. Therefore, the positive effect of phosphorus and the negative effect of Cd were both observed on the leaves number and the surface area in the treatments. The same negative effect of cadmium on the leaves surface area was shown on peas cultivated for 15 days with a 2.7-fold reduction in dry weight and surface area in comparison with peas cultivated without cadmium [5].

Fresh weights of stem (FW_S) and leaves (FW_L) were related to the number of leaves and the surface area (Table 3). Moreover, fresh weights of these aerial parts had a similar trend as leaves number and surface area in absence of phosphorus. They decreased in a non-significant way when increasing the cadmium level from 0 to 0.372 mg/L (Cd0 to Cd4) due to the stress in absence of phosphorus. Phosphorus enhanced FW_S and FW_L but these weights decreased in two ways when cadmium increased. FW_S increased by 72% and 82% between P0-P1 and P0-P2 respectively and FW_L increased by 82% and 92% in the same treatments without cadmium. A decrease by 30% and 18% was observed in FW_S and FW_L respectively when Cd level was 0.093 mg/L and reached its highest level (82%) at Cd content equal to 0.372 mg/L (Figure 2).

Cadmium has been shown to interfere with the uptake and the transport of several elements since Cd²⁺ absorption occurs via the same transmembrane carriers used to uptake Ca²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺ et Mg²⁺ leading to a disturbing of the growth of lettuces and decreasing in fresh weights [6] [7]. The weak decreases in FW_S and FW_L can be explained by the stimulatory effects of small amount of Cd. The Cd stimulation on plant growth was observed in hydroponic experiments with rice, soybean and sorghum and is related to the disruption in the homeostasis of the plants [10].

Table 3. Matrix of Pearson correlation ($n - 1$) for physiological and morphological parameters of the lettuces aerial part.

Variables	Leaves number	Surface area	FW _L	FW _S	DW _S	DW _L	DW _{AP}
Leaves number	1						
Surface area	0.9502	1					
FW _L	0.8773	0.9561	1				
FW _S	0.9063	0.9607	0.9490	1			
DW _S	0.9150	0.9268	0.8863	0.9252	1		
DW _L	0.9147	0.9530	0.8822	0.9094	0.8840	1	
DW _{AP}	0.9184	0.9634	0.9334	0.9332	0.9046	0.9757	1

**Figure 2.** Fresh weight in (g) of (a) stems and (b) leaves of lettuces as function of P and Cd.

In addition to the cadmium inhibition effects on the FW_S and FW_L, stems dry weight (DW_S) and leaves dry weight (DW_L) exposed to medium concentrations of Cd had a similar behavior as FW_S and FW_L due to the interference of Cd with the nutrients. In fact, when phosphorus was increased from P0 to P1 to P2, DW_S and DW_L increased together but they decreased in a non-significant way when Cd was added. The increase of dry weights was less than the fresh weight for the stems and leaves. It reached 50% and 67% for DW_S, 73% and 81% for DW_L in P1Cd0 and P2Cd0 compared to P0Cd0 respectively (Table 4). However, in a previous study, DW_L decrease with cadmium concentration was also observed in *Brassica juncea* in hydroponic culture when cadmium was applied between 9 and 30 mg/L [10].

The dry weight of the aerial part of lettuces DW_{AP} was positively correlated to fresh and dry weight of stems and leaves (Table 3). DW_{AP} increased by 58% and 52% when P level was 686 and 3250 mg/L compared to the treatment in absence of phosphorus and cadmium. A decrease by 48% and 65% occurs between the two couples P1Cd0/P1Cd2 and P2Cd0/P2Cd2 respectively. However, for cadmium concentrations beyond 0.186 mg/L and in presence of phosphorus, DW_{AP} values were stable while no effect of P or Cd was identified, revealing the formation of Cd-P complex that inhibited cadmium effect.

3.2. Root Part of *Lactuca sativa* Grown under Cadmium Treatments

Root length of lettuces in treatments P0 didn't show any changes when cadmium was added. The presence of 100 µM Cd didn't affect root length of lettuces after 7 days of culture in Hoagland's medium enriched with Cd(NO₃)₂ [11]. When phosphorus was added at 686 mg/L level, root length was inhibited only when cadmium was at its highest level (0.372 mg/L) and this behavior was not observed when P2 was applied enhancing the hypothesis of Cd-P complex formation in roots that inhibits cadmium absorption [4] (Table 5). Although in non-significant way, root length was increased when P was added as it is a limiting factor for plant and root growth. The reduction in root growth is due to low P-induced that inhibits cell division in the root meristem and changes of the root system architecture [19].

Table 4. Dry weights of the stems and leaves and fresh weight of the aerial parts of the lettuces in the different treatments.

Treatments		Parameters		
		DW _S (g)	DW _L (g)	DW _{AP} (g)
Phosphate	Cadmium			
P0	Cd0	0.142 ± 0.08 ^a	0.51 ± 0.07 ^a	0.647 ± 0.16 ^{ab}
	Cd1	0.164 ± 0.05 ^{ab}	0.46 ± 0.07 ^a	0.509 ± 0.1 ^{ab}
	Cd2	0.075 ± 0.003 ^a	0.53 ± 0.1 ^a	0.695 ± 0.15 ^{ab}
	Cd3	0.063 ± 0.01 ^a	0.43 ± 0.03 ^a	0.374 ± 0.14 ^a
	Cd4	0.027 ± 0.01 ^a	0.42 ± 0.03 ^a	0.419 ± 0.1 ^a
P1	Cd0	0.286 ± 0.01 ^b	1.39 ± 0.13 ^b	1.528 ± 0.24 ^c
	Cd1	0.137 ± 0.05 ^a	1 ± 0.04 ^{ab}	1.135 ± 0.09 ^{bc}
	Cd2	0.096 ± 0.03 ^a	0.68 ± 0.03 ^a	0.789 ± 0.05 ^{ab}
	Cd3	0.092 ± 0.01 ^a	0.64 ± 0.04 ^a	0.743 ± 0.03 ^{ab}
	Cd4	0.078 ± 0.03 ^a	0.55 ± 0.08 ^a	0.648 ± 0.12 ^{ab}
P2	Cd0	0.426 ± 0.12 ^c	2.77 ± 0.2 ^c	3.192 ± 0.08 ^d
	Cd1	0.469 ± 0.08 ^c	2.67 ± 0.73 ^c	3.161 ± 0.66 ^d
	Cd2	0.172 ± 0.01 ^{ab}	0.81 ± 0.14 ^{ab}	1.112 ± 0.07 ^{bc}
	Cd3	0.104 ± 0.03 ^a	0.73 ± 0.09 ^{ab}	0.764 ± 0.05 ^{ab}
	Cd4	0.096 ± 0.02 ^a	0.7 ± 0.2 ^a	0.793 ± 0.21 ^{ab}

Means within columns followed by the same letters do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ($\alpha = 0.05$).

Table 5. Root length, fresh and dry weights of roots of the lettuces.

Treatments		Parameters		
		Root length (cm)	FW _R (g)	DW _R (g)
Phosphate	Cadmium			
P0	Cd0	16 ± 4.1 ^{abcd}	1.34 ± 0.5 ^{abcd}	0.156 ± 0.0045 ^{bc}
	Cd1	17 ± 0.4 ^{abcd}	1.3 ± 0.3 ^{abc}	0.157 ± 0.0029 ^{bc}
	Cd2	14 ± 1.2 ^{abcd}	1.2 ± 0.4 ^{abc}	0.159 ± 0.0087 ^{bc}
	Cd3	14 ± 2.5 ^{abc}	0.38 ± 0.08 ^a	0.048 ± 0.0079 ^a
	Cd4	13 ± 0.6 ^{ab}	0.63 ± 0.2 ^a	0.052 ± 0.0136 ^a
P1	Cd0	18 ± 0.9 ^{cd}	2.72 ± 0.3 ^d	0.136 ± 0.0165 ^{ab}
	Cd1	18 ± 0.8 ^{cd}	2.56 ± 0.5 ^{cd}	0.134 ± 0.0187 ^{ab}
	Cd2	16 ± 1.4 ^{abcd}	1.54 ± 0.1 ^{abcd}	0.088 ± 0.0048 ^{ab}
	Cd3	15 ± 0.4 ^{abcd}	1.23 ± 0.1 ^{abc}	0.081 ± 0.0014 ^{ab}
	Cd4	13 ± 2.5 ^a	1.04 ± 0.3 ^{ab}	0.063 ± 0.0188 ^{ab}
P2	Cd0	18 ± 0.6 ^{bcd}	5.14 ± 1 ^e	0.246 ± 0.0656 ^{cd}
	Cd1	19 ± 0.6 ^d	5.3 ± 0.7 ^e	0.303 ± 0.0784 ^d
	Cd2	17 ± 0.7 ^{abcd}	2.25 ± 0.6 ^{bcd}	0.1 ± 0.0055 ^{ab}
	Cd3	17 ± 1 ^{abcd}	1.71 ± 0.2 ^{abcd}	0.107 ± 0.009 ^{ab}
	Cd4	17 ± 0.2 ^{abcd}	1.29 ± 0.26 ^{abc}	0.097 ± 0.0297 ^{ab}

Means within columns followed by the same letters do not differ significantly according to Duncan's multiple range test ($\alpha = 0.05$).

Unlike the root length, the fresh weight of roots (FW_R) decreased when phosphorus was absent and when cadmium was increased in the nutrient solution. FW_R increased when phosphorus increased. It increased by 67% and 80% in P1 and P2 respectively compared to P0. Under the same phosphorus concentration, FW_R decreased by an average of 64% in P1Cd4 and P2Cd2 compared to P1Cd0 and P2Cd0 respectively. At high P level (P2), FW_R wasn't affected by Cd when its concentration was above 0.186 mg/L (Table 5).

The same behavior was observed for the dry weight of the roots (DW_R) with an exception of a 70 % reduction in DW_R when lettuces were grown in treatment without phosphorus and under high concentration levels of cadmium (Cd3 and Cd4). Root length, FW_R and DW_R were found positively correlated but in moderate way (0.4 - 0.6). Thus it can be due to an increase of the density of the lateral roots and reduction of the primary root length in response to low P availability and cadmium presence. Previous studies reported that low P level induce the increase of lateral root number and density over primary root growth [19] [20].

3.3. Cadmium Transfer to *Lactuca sativa*

Most of the cadmium was accumulated in lettuces roots when the concentration of this heavy metal was greater than 0.186 mg/L and in absence of phosphorus. When phosphorus level and cadmium was increased together in the nutrient solution till 299 mg P/L (P1) and 0.093 mg Cd/L, cadmium level found in the roots was increased and the one in the aerial part was diminished (Figure 3). Cadmium in aerial part and roots was increased in the treatment P2Cd0 compared to P0Cd0.

In fact, phosphorus had a role in developing the root system. Hence it is not surprising to find that cadmium absorption is more important in presence of phosphorus than in its absence, but the absorption varies with the cadmium availability to plants. The quantity transferred to the stems and leaves was almost the same in all the treatments. Accordingly, the partition of the cadmium in different lettuces parts could be a useful strategy to avoid toxicity in aerial parts.

Iron found in lettuces roots was more abundant than in aerial parts. Its absorption decreased when phosphorus was added no matter the cadmium concentration present in the nutrient solution. However, Zinc had a different behavior. Zn was accumulated in the leaves then in roots and the smallest amount of zinc was found in the stems (Table 6).

It is known in the literature that cadmium absorption is influenced by the presence of zinc since they belong to the same group in the periodic table and have a similar nuclear structure and ionic radius [21] [22]. In this study, Zn was found inversely proportional to Cd and in the tissues where cadmium was present in large quantities, Zn was very low and vice-versa, thus a competition between those elements [21] [23] [24]. In fact, an antagonistic interaction for Cd and Zn uptake and translocations by plants was demonstrated by several authors [25] [26].

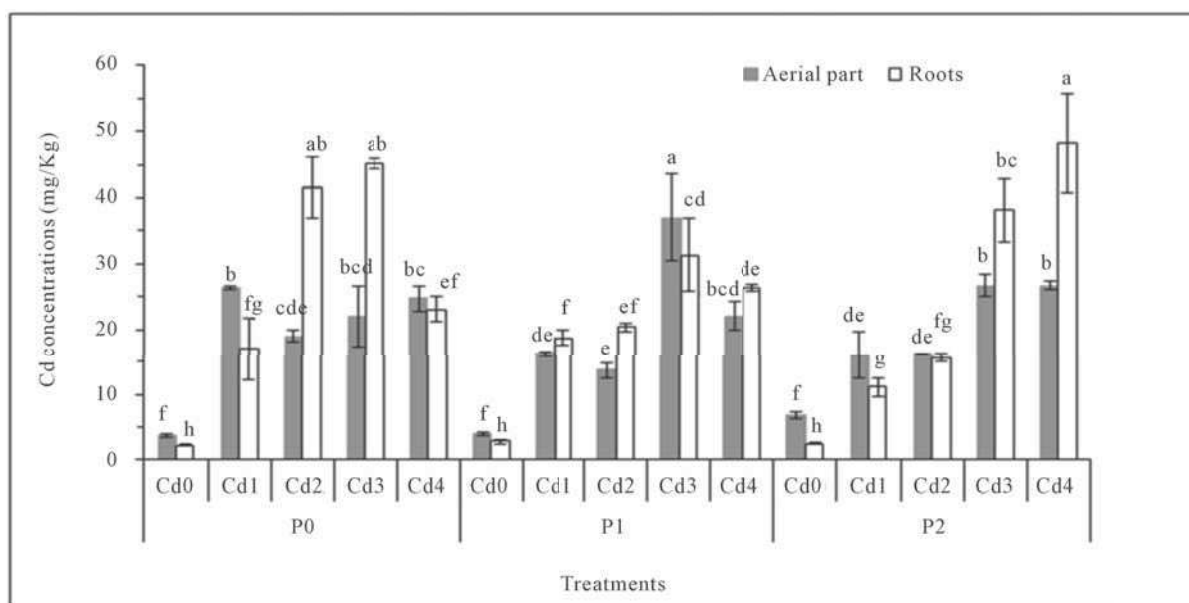


Figure 3. Cadmium levels in aerial and root parts of lettuces in all treatments.

Table 6. Iron and zinc concentrations in the different parts of the lettuces.

Phosphate levels	Elements				
	Fe (mg/g)		Zn (mg/g)		
	Aerial parts	Roots	Leaves	Stems	Roots
P0	299.8 ± 52	3364 ± 231	592 ± 39	23 ± 9	38 ± 1.5
P1	70.4 ± 7	1606 ± 185	478 ± 42	16 ± 2	53 ± 5.6
P2	49.5 ± 7.5	950 ± 147	435 ± 56	19 ± 1.1	66 ± 4

4. Conclusions

Phosphate fertilizer was found to increase leaves number, surface area, root elongation and fresh and dry weight of stems and leaves. Phosphorus had an important role in developing the root system. However, cadmium induced opposite effects on the plants when present in the nutrient solution; it conducted the death and the necrosis of some lettuces plants. On the other hand, cadmium had decreased fresh and dry weights of stems and leaves, root length and fresh and dry weight of roots. In highly cadmium contaminated nutrient solution, roots of *Lactuca sativa* absorbed the cadmium that was transferred to the aerial lettuces parts. Absorption of Cd was influenced by the presence of Zn in the nutrient solution that was accumulated in the stems and leaves of the plants while Fe and Cd were accumulated in the roots. With increasing Cd concentration in the Hoagland solution and at high P level, the absorption and transfer of cadmium increased for both in the roots and the aerial parts.

Despite the easiness and rapidity of crop growth in hydroponic culture, this system may become a potential source of bioavailable cadmium that is absorbed by lettuces and transferred to roots and aerial parts conducting at least to deep morphological changes. The sufficient presence of phosphorus in nutrient media may inhibit cadmium or iron absorption by the plants. Therefore, a particular attention must be done when Cd enriched phosphate fertilizers are used in hydroponic culture cycles.

Acknowledgements

This research has been financed by research grant programs of the Lebanese University and the Lebanese Agriculture Research Institute. The authors would like to thank an anonymous reviewer for helpful comments that improved the clarity of this paper.

References

- [1] Belon, E., Boisson, M., Deportes, I.Z., Eglin, T.K., Feix, I., Bispo, A.O., Galsomies, I., Leblond, S. and Guellier, C.R. (2012) An Inventory of Trace Elements Inputs to French Agricultural Soils. *Science of the Total Environment*, **439**, 87-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.011>
- [2] Thakur, S.K., Tomar, N.K. and Pandeya, S.B. (2006) Influence of Phosphate on Cadmium Sorption by Calcium Carbonate. *Geoderma*, **130**, 240-249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.01.026>
- [3] Kirkham M.B. (2006) Cadmium in Plants on Polluted Soils: Effects of Soil Factors, Hyperaccumulation, and Amendments. *Geoderma*, **137**, 19-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024>
- [4] Dheri, G.S., Brar, M.S. and Malhi, S.S. (2007) Influence of Phosphorus Application on Growth and Cadmium Uptake of Spinach in Two Cadmium-Contaminated Soils. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*, **170**, 495-499. <http://dx.doi.org/10.1002/jpln.200625051>
- [5] Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A. and Sandalio, L.M. (2004) Cadmium-Induced Subcellular Accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in Pea Leaves. *Plant, Cell & Environment*, **27**, 1122-1134. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x>
- [6] Dias, M.C, Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B. and Santos, C. (2012) Cadmium Toxicity Affects Photosynthesis and Plant Growth at Different Levels. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**, 1281-1289.
- [7] Das, P., Samantaray, S. and Rout, G.R. (1997) Studies on Cadmium Toxicity in Plants: A Review. *Environmental Pollution*, **98**, 29-36. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00110-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00110-3)
- [8] Lopez-Millan, A.-F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A. and Abadía, J. (2009) Cadmium Toxicity in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Plants Grown in Hydroponics. *Environmental and Experimental Botany*, **65**, 376-385.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.11.010>
- [9] Zorrig, W., Rouached, A., Shahzad, Z., Abdelly, C., Davidian, J.-C. and Berthomieu, P. (2010) Identification of Three Relationships Linking Cadmium Accumulation to Cadmium Tolerance and Zinc and Citrate Accumulation in Lettuce. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 1239-1247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.012>
- [10] Armas, T., Pinto, A.P., de Varennes, A., Mourato, M.P., Martins, L.L., Gonçalves Simões, L.L. and Mota, A.M. (2015) Comparison of Cadmium-Induced Oxidative Stress in *Brassica juncea* in Soil and Hydroponic Cultures. *Plant and Soil*, **388**, 297-305. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-014-2330-3>
- [11] Monteiro, M.S., Santos, C., Soares, A.M.V.M. and Mann, R.M. (2009) Assessment of Biomarkers of Cadmium Stress in Lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 811-818. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.08.002>
- [12] Feltrim, A.L., Filho, A.B.C., Branco, R.B.F., Barbose, J.C. and Salatiel, L.T. (2005) Yield of American Lettuce Cultivated in Soil and Hydropony during Winter and Summer Seasons, in Jaboticabal, SP. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **9**, 505-509. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662005000400010>
- [13] Domingues, D.S., Takahashi, H.W., Camara, C.A.P. and Nixdorf, S.L. (2012) Automated System Developed to Control pH and Concentration of Nutrient Solution Evaluated in Hydroponic Lettuce Production. *Computers and Electronics in Agriculture*, **84**, 53-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2012.02.006>
- [14] Liu, Y., Vijer, M.G. and Peijnenburg, W.J.G.M. (2014) Impacts of Major Cations (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) and Protons on Toxicity Predictions of Nickel and Cadmium to Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Using Exposure Models. *Ecotoxicology*, **23**, 385-395. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-014-1202-1>
- [15] Astolfi, S., Zuchi, S. and Passera, C. (2004) Effects of Cadmium on the Metabolic Activity of *Avena sativa* Plants Grown in Soil or Hydroponic Culture. *Biologia Plantarum*, **48**, 413-418. <http://dx.doi.org/10.1023/B:BIOP.0000041095.50979.b0>
- [16] Niu, Z.-X., Sun, L.-N., Sun, T.-H., Li, Y.-S. and Wang, H. (2007) Evaluation of Phytoextracting Cadmium and Lead by Sunflower, Ricinus, Alfalfa and Mustard in Hydroponic Culture. *Journal of Environmental Sciences*, **19**, 961-967. [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60158-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60158-2)
- [17] Costa, E. and Leal, P.A.M. (2009) Produção de alface hidropônica em três ambientes de cultivo. *Engenharia Agrícola, Jaboticaba*, **29**, 358-369. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162009000300003>
- [18] Waisberg, M., Black, W.D., Waisberg, C.M. and Hale, B. (2004) The Effect of pH, Time and Dietary Source of Cadmium on the Bioaccessibility and Adsorption of Cadmium to/from Lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Ostinata). *Food Chemical and Toxicology*, **42**, 835-842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2004.01.007>
- [19] Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Gutiérrez-Ortega, A., Hernández-Abreu, E. and Herrera-Estrella, L. (2006) Characterization of Low Phosphorus Insensitive Mutants Reveals a Crosstalk between Low Phosphorus-Induced Determinate Root Development and the Activation of Genes Involved in the Adaptation of Arabidopsis to Phosphorus Deficiency. *Plant Physiology*, **140**, 879-889. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.105.073825 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.073825>
- [20] Williamson, L.C., Ribrioux, S.P.C.P., Fitter, A.H. and Leyser, H.M.O. (2001) Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **126**, 875-882. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.126.2.875>
- [21] Köleli, N., Eker, S. and Cakmak, I. (2004) Effect of Zinc Fertilization on Cadmium Toxicity in Durum and Bread Wheat Grown in Zinc-Deficient Soil. *Environmental Pollution*, **131**, 453-459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2004.02.012>
- [22] Lambert, R., Grant, C. and Sauvé, S. (2007) Cadmium and Zinc in Soil Solution Extracts Following the Application of Phosphate Fertilizers. *Science of the Total Environment*, **378**, 293-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.008>
- [23] Gao, X., Mohr, R.M., McLaren, D.L. and Grant, C.A. (2011) Grain Cadmium and Zinc Concentrations in Wheat as Affected by Genotypic Variation and Potassium Chloride Fertilization. *Field Crops Research*, **122**, 95-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2011.03.005>
- [24] Rojas-Cifuentes, G.A., Johnson, B.L., Berti, M.T. and Norvell, W.A. (2012) Zinc Fertilization Effects on Seed Cadmium Accumulation in Oilseed and Grain Crops Grown on North Dakota Soils. *Chilean Journal of Agricultural Research*, **72**, 117-124. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000100019>
- [25] Gupta, D.K., Chatterjee, S., Datta, S., Veer, V. and Walther, C. (2014) Role of Phosphate Fertilizers in Heavy Metal Uptake and Detoxification of Toxic Metals. *Chemosphere*, **108**, 134-144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.030>
- [26] Salah, S.A. and Barrington, S.F. (2006) Effect of Soil Fertility and Transpiration Rate on Young Wheat Plants (*Triticum aestivum*) Cd/Zn Uptake and Yield. *Agricultural Water Management*, **82**, 177-192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2005.06.002>