



# La phytostabilisation des laitiers d'acier : Rôle du pH, des champignons mycorhiziens et des bactéries rhizosphériques

Mathieu Scattolin

## ► To cite this version:

Mathieu Scattolin. La phytostabilisation des laitiers d'acier : Rôle du pH, des champignons mycorhiziens et des bactéries rhizosphériques. Environnement et Société. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSEM032 . tel-03481351

**HAL Id: tel-03481351**

**<https://theses.hal.science/tel-03481351>**

Submitted on 15 Dec 2021

**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.



N° d'ordre NNT : 2020LYSEM032

**THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON**  
opérée à  
**l'École des Mines de Saint-Étienne**

**École Doctorale N° 488**  
**Sciences, Ingénierie, Santé**

**Spécialité de doctorat :**  
**Discipline :** Génie environnement

Soutenue à huis clos le 15/12/2020, par :  
**Mathieu Scattolin**

---

**La phytostabilisation des laitiers d'acier :  
Rôle du pH, des champignons mycorhiziens et des  
bactéries rhizosphériques**

---

Devant le jury composé de :

Chalot, Michel - Professeur - Université de Bourgogne Franche-Comté	<b>Président</b>
Mench, Michel - Directeur de recherche - Université de Bordeaux	<b>Rapporteur</b>
Benizri, Emile - Professeur - Université de Lorraine	<b>Rapporteur</b>
Delerue, Florian - Maître de conférence - Université de Bordeaux	<b>Examineur</b>
Graillet, Didier - Directeur de recherche - Mines Saint-Etienne	<b>Directeur</b>
Faure, Olivier - Maître de conférence - Université Jean monet	<b>Co-directeur</b>
Pereira, Fernando - Ingénieur de recherche - Mines Saint-Etienne	<b>Co-directeur</b>

Spécialités doctorales	Responsables :	Spécialités doctorales	Responsables
SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX	K. Wolski Directeur de recherche	MATHEMATIQUES APPLIQUEES	O. Roustant, Maître-assistant
MECANIQUE ET INGENIERIE	S. Drapier, professeur	INFORMATIQUE	O. Boissier, Professeur
GENIE DES PROCÉDES	F. Gruy, Maître de recherche	SCIENCES DES IMAGES ET DES FORMES	JC. Pinoli, Professeur
SCIENCES DE LA TERRE	B. Guy, Directeur de recherche	GENIE INDUSTRIEL	N. Absi, Maître de recherche
SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT	D. Grailiot, Directeur de recherche	MICROELECTRONIQUE	Ph. Lalevée, Professeur

**EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'Etat ou d'une HDR)**

ABSI	Nabil	MR	Génie industriel	CMP
AUGUSTO	Vincent	CR	Image, Vision, Signal	CIS
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BADEL	Pierre	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2	Informatique	FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR	Sciences et génie des matériaux	SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BEIGBEDER	Michel	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
BLAYAC	Sylvain	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BONNEFOY	Olivier	PR	Génie des Procédés	SPIN
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
CAMEIRAO	Ana	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
CHRISTIEN	Frédéric	PR	Science et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	MR	Sciences des Images et des Formes	SPIN
DEGEORGE	Jean-Michel	MA(MDC)	Génie industriel	Fayol
DELAFOSSE	David	PR0	Sciences et génie des matériaux	SMS
DELORME	Xavier	MA(MDC)	Génie industriel	FAYOL
DESRAYAUD	Christophe	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DJENIZIAN	Thierry	PR	Science et génie des matériaux	CMP
BERGER-DOUCE	Sandrine	PR1	Sciences de gestion	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DUTERTRE	Jean-Max	MA(MDC)		CMP
EL MRABET	Nadia	MA(MDC)		CMP
FAUCHEU	Jenny	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
FAVERGEON	Loïc	CR	Génie des Procédés	SPIN
FEILLET	Dominique	PR1	Génie Industriel	CMP
FOREST	Valérie	MA(MDC)	Génie des Procédés	CIS
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Sciences de la Terre	SPIN
GAVET	Yann	MA(MDC)	Sciences des Images et des Formes	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURLOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GONDAN	Natacha	MA(MDC)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
GONZALEZ FELIU	Jesus	MA(MDC)	Sciences économiques	FAYOL
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
HAN	Woo-Suck	MR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NAVARRO	Laurent	CR		CIS
NEUBERT	Gilles			FAYOL
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre	Ingénieur de recherche	Mécanique et ingénierie	CMP
NORTIER	Patrice	PR1	Génie des Procédés	SPIN
O CONNOR	Rodney Philip	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
PICARD	Gauthier	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
PINOLI	Jean Charles	PR0	Sciences des Images et des Formes	SPIN
POURCHEZ	Jérémy	MR	Génie des Procédés	CIS
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)	Mathématiques appliquées	FAYOL
SANAUR	Sébastien	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
SERRIS	Eric	IRD		FAYOL
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	PR2	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	DR	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR0	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

## **Financement**

Démarré en janvier 2018 sous la coordination de Fernando Perreira, le projet ANR HYPASS (Approches hydrométallurgique et de phytomanagement pour la gestion des laitiers sidérurgiques) vise à développer une démarche technologique pour récupérer les métaux valorisables de déchets sidérurgiques, les laitiers, tout en assurant une gestion écologique et durable des terrils métallurgiques. Il a permis le financement de la présente thèse, dont la thématique s'inscrit dans le développement du projet.

L'objectif du projet HYPASS est de développer une démarche technologique innovante permettant simultanément la récupération des métaux d'intérêt stratégique des laitiers ainsi qu'une gestion se voulant plus écologique des décharges métallurgiques. Dans cette optique, HYPASS s'intéressera à la problématique dans son ensemble au travers de la caractérisation des stocks existants de laitiers disponibles, du développement de nouvelles technologies d'extraction des ressources métalliques valorisables et finalement d'exploration de nouvelles méthodes de gestion de décharges contaminées; le but ultime du projet étant de développer, en aval de la production des laitiers, une procédure de gestion "zéro déchets" se voulant autant que possible économiquement viable et acceptable d'un point de vue environnemental.

Ce projet regroupe deux partenaires académiques (ARMINES/SPIN et BRGM) et un partenaire industriel (Industeel France ArcelorMittal).

## **Funding**

Launched in January 2018 under the coordination of Fernando Perreira, the ANR HYPASS project (HYdrometallurgy and Phytomanagement Approaches for Steel Slag management) aims to develop a technological approach to recover valuable metals from steel slag, while ensuring an ecological and sustainable management of metallurgical slag heaps. It allowed the financing of the present thesis, whose theme is part of the development of the project.

The objective of the HYPASS project is to develop an innovative technological approach allowing simultaneously the recovery of metals of strategic interest from slag as well as a more ecological management of metallurgical dumps. In this perspective, HYPASS will focus on the problem as a whole through the characterization of existing stocks of available slag, the development of new technologies for the extraction of recoverable metal resources and finally the exploration of new methods for the management of contaminated landfills; the ultimate goal of the project is to develop, downstream of the slag production, a "zero waste" management procedure that is as economically viable and acceptable from an environmental point of view as possible.

This project brings together two academic partners (ARMINES/SPIN and BRGM) and an industrial partner (Industeel France ArcelorMittal).

## Résumé

Les laitiers sont des déchets générés par les industries métallurgiques. Il s'agit de matières minérales particulièrement riches en métaux. Pendant des décennies, ces matériaux ont été largement stockés sous la forme de terrils et constituent désormais des nuisances potentielles pour l'environnement et la santé publique. En effet, les transferts potentiels de métaux contenus dans ces décharges sidérurgiques, qu'ils soient dirigés vers l'atmosphère, les sols environnants, les eaux de surface ou souterraines et finalement vers des récepteurs biologiques, constituent une source de danger pour les écosystèmes. C'est pourquoi ces sites de dépôt requièrent le développement de méthodes de gestion durable qui pourraient se trouver dans les approches de dépollution biologiques.

La phytostabilisation consiste à mettre en place une couverture végétale sur un site pollué afin de réduire les flux de polluants vers les milieux environnants : Ce procédé vise essentiellement à réduire la biodisponibilité des métaux, concept défini comme étant le degré auquel les polluants présents dans le sol peuvent être absorbés ou métabolisés par des êtres vivants, ou être disponibles pour interaction avec des systèmes biologiques. Ainsi, les espèces végétales employées doivent présenter des caractères phénotypiques leur permettant de se développer dans ces substrats marginaux, tel que la capacité à exclure les contaminants des tissus de la plante. Dans ce contexte, la faisabilité d'une phytostabilisation et l'efficacité d'une bioaugmentation pour réhabiliter une friche industrielle de stockage de laitiers d'acier sont abordées dans ce travail. Puisque ce substrat est *a priori* dépourvu de vie, une décharge de laitier d'acier constitue un excellent terrain d'étude pour appréhender les processus conduisant à mise en place d'un écosystème durable : La compréhension des processus biogéochimiques régissant les propriétés du sol, les plantes et la microflore s'y développant doit permettre une gestion plus efficace de ces types de déchets.

La capacité des procédés de phytostabilisation à réduire les flux de contaminants vers les environnements adjacents est fortement dépendante de l'efficacité avec laquelle le substrat est colonisé par les végétaux. Ainsi, l'installation durable d'un couvert végétal sur les technosols que constituent les dépôts de laitiers sidérurgiques nécessite l'initiation d'une pédogenèse favorable à son développement et à sa résilience. L'utilisation de MIATE (Boues de stations d'épuration compostées avec des déchets verts) en tant qu'amendement constitue en cela une

approche prometteuse. En dehors du fait qu'il confère au substrat la capacité de retenir l'eau tout en apportant les éléments nutritifs et la matière organique indispensable au développement des plantes, il permet d'ajuster le pH dans une gamme limitant la mobilité des éléments métalliques potentiellement toxiques, tout en augmentant celle des macro et des micro-nutriments essentiels. Lorsque cette gamme de pH favorable est atteinte ( $< 8,6$ ), l'inoculation de la souche d'AMF *R. irregularis* (DAOM197198) permet d'améliorer la nutrition des plantes rapidement après leur implantation, notamment en abaissant d'autant plus le pH du substrat que par apport de MIATE seul. Enfin, la bioprospection de PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria : bactéries promotrices de la croissance végétale) sur des parcelles de phytostabilisation implantées sur le site d'étude a conduit à l'identification de souches potentiellement utiles pour la conduite de projets de végétalisation de décharges de laitiers d'acier.

Des travaux supplémentaires permettraient de vérifier que ces souches bactériennes, qu'elles soient inoculées seules ou en consortium, favorisent effectivement la croissance des plantes à long terme, leurs tolérance aux contraintes rencontrées sur ce milieu et donc le procédé de phytostabilisation. D'autres essais de bioprospection peuvent également être envisagés afin de sélectionner d'avantage de PGPB présumées ainsi que des AMF indigènes. La poursuite d'études visant à mieux comprendre les dynamiques biogéochimiques ayant cours dans ces substrats marginaux est également nécessaire, particulièrement en se penchant sur les différents aspects sur lesquels le pH intervient, afin de maximiser les chances d'initiation de pédogenèse et de mise en œuvre d'une phytostabilisation sur ces technosols. L'extrapolation des préconisations mises en évidence dans ces travaux de thèse à l'ensemble du terroir d'étude pourrait permettre, par le suivi du développement de la végétation et des interactions vivantes s'y déroulant, d'étudier les successions écologiques ayant cours sur ce terrain aux caractéristiques très marginales.

## Abstract

Slags are wastes generated by the metallurgical industries. Those artificial mineral materials are particularly rich in metals. For decades, these materials have been largely stored in slag heaps and now constitute a potential nuisance for the environment and public health. Indeed, the potential transfers of metals contained in these landfills, whether to the atmosphere, the surrounding soil, surface or ground water and ultimately to biological receptors, are a source of danger for ecosystems. This is why these deposition sites require the development of sustainable management methods that could be found in biological remediation approaches.

Phytostabilization consists in establishing a plant cover on a polluted site in order to reduce the flow of pollutants to the surrounding environment: This process essentially aims to reduce the bioavailability of metals, a concept defined as the degree to which chemicals present in the soil can be absorbed or metabolized by a human or ecological receptor, or be available for interaction with biological systems. Thus, the plant species used must have phenotypic characteristics that allow them to grow in these types of substrates, such as the ability to exclude contaminants from the plant tissue. In this context, the feasibility of phytostabilization and the effectiveness of bioaugmentation to rehabilitate a brownfield steel slag storage site are addressed in this work. Since this substrate is a priori devoid of life, a steel slag landfill constitutes an excellent field of study to understand the ins and outs of the implementation of a sustainable ecosystem: The understanding of the biogeochemical processes governing the properties of the soil, the plants and the microflora developing there should allow a more efficient management of these types of waste.

The ability of phytostabilization processes to reduce contaminant flows to adjacent environments is highly dependent of the efficiency with which the substrate is colonized by plants. Thus, the sustainable installation of a plant cover on the technosols constituted by steel slag deposits requires the initiation of a pedogenesis favorable to its development and resilience. The use of CSS (Composted Sewage Sludge) as an amendment is a promising approach. Apart from the fact that it gives the substrate the capacity to retain water while providing the nutrients and organic matter essential for plant development, it allows the pH to be adjusted within a range that limits the mobility of toxic metallic elements, while improving the mobility of essential macro and micro-nutrients. When this favorable pH range is reached (< 8.6), inoculation of the AMF *R. irregularis* strain (DAOM197198) allows improving plant

nutrition rapidly after implantation, especially by lowering the pH of the substrate as much as by the addition of MIATE alone. Bioprospecting of PGPB on phytostabilization plots implanted on the study site led to the identification of strains potentially useful for the conduct of projects for the revegetation of steel slag dumps.

Further work would help to verify that these bacterial strains, inoculated alone or as consortium, actually promote long-term plant growth, their tolerance to the constraints encountered in this environment and thus the phytostabilization process. Other bioprospecting trials may also be considered in order to select more potential PGPBs as well as indigenous AMFs. Further studies are needed to better understand the biogeochemical dynamics in these marginal substrates, particularly by looking at the different aspects in which pH is involved, in order to maximize the chances of pedogenesis initiating and implementing phytostabilization on these technosols. The extrapolation of the recommendations highlighted in this thesis works to the whole study slag heap could allow, by monitoring the development of vegetation and the living interactions taking place in the ecosystem, to study the ecological successions taking place on this terrain with very marginal characteristics.



# Table des matières

Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des abréviations.....	13
Avant-Propos.....	15
<b>Chapitre 1. Erreur ! Signet non défini.</b>	<b>19</b>
1.1. Erreur ! Signet non défini.	20
a) Origines des contaminations métalliques .....	20
<i>Sources naturelles</i> .....	20
<i>Sources anthropiques</i> .....	22
b) Spéciation des ETs dans les sols.....	27
<i>Définitions du milieu sol</i> .....	27
<i>Spéciation chimique et transferts dans les sols</i> .....	28
c) Biodisponibilité des ETs, essentialité et toxicité .....	29
1. Erreur ! Signet non défini.	31
a) Description des principes .....	31
<i>Avantages par rapport aux méthodes conventionnelles</i> .....	31
<i>Phytomanagement de la pollution inorganique</i> .....	33
<i>Enjeux d'un procédé de phytostabilisation</i> .....	33
b) Les composantes d'un phytomanagement .....	34
<i>Espèces végétales à semer</i> .....	35
<i>Amendement et nutrition des plantes</i> .....	37
<i>Micro-organismes et interactions avec les végétaux</i> .....	39
1. Erreur ! Signet non défini.	43

a) Objectifs et méthodologie .....	43
b) Résultats et perspectives .....	44
<b>Chapitre 2. Aciers et laitiers .....</b>	<b>61</b>
<b>2.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.a production d'acier.....</b>	<b>62</b>
a) Brève histoire de la fabrication de l'acier .....	62
<i>Histoire ancienne : apparition de la métallurgie du fer .....</i>	<i>62</i>
<i>Révolution industrielle et ingénierie du fer .....</i>	<i>64</i>
<i>Arrivée des aciers spéciaux et des procédés modernes .....</i>	<i>65</i>
b) Filières actuelles et production mondiale .....	67
<i>Filières d'élaboration des aciers .....</i>	<i>67</i>
<i>Chiffres de la production d'acier.....</i>	<i>67</i>
<b>2.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Les coproduits de l'acier : les laitiers .....</b>	<b>69</b>
a) Des déchets spécifiques aux procédés .....	69
<i>Origine et définition des laitiers .....</i>	<i>69</i>
<i>Filières de production des laitiers .....</i>	<i>70</i>
b) Laitiers disponibles.....	72
<i>Stocks de laitiers .....</i>	<i>72</i>
<i>Présentation du site d'étude (Industeel France ArcelorMittal) et de son terroir .....</i>	<i>73</i>
<b>Chapitre 3. Objectifs du travail.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.76</b>	<b>76</b>
<b>3.2.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.76</b>	<b>76</b>
3.3. Le projet ANR HYPASS .....	77
<b>Chapitre 4. Le laitier d'Industeel France ArcelorMittal .....</b>	<b>81</b>
<b>4.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Composition chimique des laitiers .....</b>	<b>82</b>

a) Comparaison des compositions chimiques des laitiers de fer, d'acier et d'IFAM .....	82
b) Caractérisation granulométrique du laitier d'IFAM.....	84
<b>4.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.Erreur ! Signet non défini.</b> Caractérisation morphologique et minéralogique du laitier d'IFAM .....	85
<b>Chapitre Erreur ! Signet non défini. Aided-phytostabilization of steel slag dumps: the key-role of pH adjustment in decreasing chromium toxicity and improving manganese, phosphorus and zinc phytoavailability</b> .....	93
<b>Chapitre 6. The use of Rhizophagus irregularis (DAOM197198) and CSS in aided-phytostabilization of steel slag to increase plants nutrition.....</b>	127
<b>Chapitre 7. Characterization of plant-associated bacteria from an 8-years old phytostabilized technosoil .....</b>	153
<b>Conclusion générale.....</b>	191
<b>Perspectives.....</b>	194

## Liste des tableaux

Tableau I : Phytotechnologies les plus fréquemment utilisées

Tableau II : Concentrations moyennes en éléments dosés dans les parties aériennes sèches de plantes requises pour une croissance normale

Tableau III : Evolution de la production d'acier brut et de laitiers (en Mt) en France entre 2008 et 2017

Tableau IV : Résumé de la chimie des éléments majeurs, mineurs et traces par type de laitier de près de 70 études comparées à celles obtenues sur le laitier d'IFAM

## Liste des figures

Figure 1 : Comparaison de la mobilisation anthropique de 77 éléments par rapport à leur mobilisation naturelle

Figure 2 : Potentielles interactions plante-bactérie influençant l'accumulation d'éléments traces dans les plantes

Figure 3 : Photographies des 9 couples de Semis/Amendement des parcelles PHYSAFIMM, 3 ans après la préparation des parcelles et le semis des graines

Figure 4 : Production mondiale d'acier brut en fonction des divers procédés d'élaboration depuis 1860

Figure 5 : Production mondiale d'acier brut de 1950 à 2018 et production mondiale d'acier brut en 2018 (% des 1808 Mt produites)

Figure 6 : Schéma simplifié des procédés d'élaboration du fer, des aciers et de production des différents laitiers associés

Figure 7 : Répartition géographique des stocks français de laitiers d'aciérie en 2018 (en kT)

Figure 8 : Vue aérienne de la décharge sidérurgique d'Industeel-France ArcelorMittal

Figure 9 : Proportion massique et composition chimique de chaque fraction granulométriques triées

Figure 10 : Caractérisation morphologique MEB de trois grains distincts de laitier d'IFAM

Figure 11 : Composition chimique semi-qualitative MEB/EDS de trois grains distincts de laitier d'IFAM

Figure 12 : Composition minéralogique DRX des fractions (-5 +2 mm) et (-63 µm) préalablement broyées à (-63 µm)

Figure 13 : Etat de la parcelle expérimentale amendée de MIATE (120 T.ha<sup>-1</sup>) 1 mois après le semis et 6 mois après le semis

Figure 14 : Illustration de la segmentation du vert pour la détection de la végétation

Figure 15 : Préconisations mises en évidence pour initier une phytostabilisation sur terril de laitier d'aciérie et perspectives à ces travaux de thèse

## Liste des abréviations

ET	Éléments Traces
ppm	partie par million (mg.kg <sup>-1</sup> )
ADEME	Agence de la transition énergétique
REFIOM	Résidus d'Épuration des Fumées d'Incinération des Ordures Ménagères
MIOM	Mâchefers d'Incinération des Ordures Ménagères
BASIAS	Base de données des Anciens Sites Industriels et Activités de Services
NPK	Amendement minéral (N : Azote, P : Phosphore, K : Potassium)
BRF	Bois Raméal Fragmenté
MIATE	Matières d'Intérêt Agronomique issues du Traitement des Eaux
AMF	Champignon Mycorhizien à Arbuscules (Arbuscular Mycorrhizal Fungi)
PHYSAFIMM	la PHYtoStabilisation : méthodologie Applicable aux Friches Industrielles Métallurgiques et Minières
IFAM	Industeel France ArcelorMittal
BF	Haut fourneau (Blast Furnace)
EAF	Four à arc électrique (Electric Arc Furnace)
BOS	Oxygène de base sidérurgie (Basic Oxygen Steelmaking)
BOF	Convertisseurs à oxygène (Basic Oxygen Furnace)
AOD	Décarburation à l'argon et à l'oxygène (Argon Oxygen Decarburization)
LD	Four à poche (Ladle Furnace)
SAFIR	Sites Atelier Français pour l'Innovation et la Recherche
ACV	Analyse du Cycle de Vie
HYPASS	HYdrometallurgy and Phytomanagement Approaches for Steel Slag management

ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique - plasma à couplage inductif (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry)
ICP-MS	Spectrométrie de masse - plasma à couplage inductif (Inductively Coupled Plasma-Mass spectrometry)
LOI	Perte au feu (Loss On Ignition)
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
EDS	Spectroscopie de rayon X à dispersion d'énergie (Energy Dispersive x-ray Spectroscopy)
CFU	Unité formant colonie (Colony Forming Unit)
IAA	Acide indole 3-acétique (Indole 3-Acetic Acid)



## Avant-propos

Les activités humaines modifient notre environnement à bien des échelles. L'exploitation des ressources, de l'extraction à la consommation, affecte les écosystèmes. Les déchets sont inhérents à toutes ces activités anthropiques. Selon le code français de l'environnement, "*Est considéré comme déchet tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matière, produit [...] que son détenteur destine à l'abandon*" (article L.541-1-1-1). A l'échelle mondiale, tous les types de déchets (industriels, agricoles, ménagers, *etc.*) ont une tendance commune : les volumes produits et ceux existants augmentent. Les estimations montrent que d'ici 30 ans, la production mondiale de déchets sera 70 % plus importante (Kaza *et al.*, 2018).

La Banque mondiale estime que les industries produisent 12,7 kg de déchets par jour et par habitant dans le monde, soit 18 fois plus de déchets que ceux produits par les ménages. De plus, les coûts de manutention des déchets destinés à l'élimination ou au stockage ont également augmenté, ce qui limite les municipalités dans la gestion de leurs effluents et de leurs décharges. Une grande partie des déchets industriels sont dangereux (*e.g.*, amiante, substances radioactives, solvants, hydrocarbures, scories, *etc.*). Particulièrement difficiles à traiter, ils sont également considérés comme toxiques pour l'environnement. Lorsqu'ils sont peu ou mal gérés, ces déchets conduisent la plupart du temps à une contamination des écosystèmes. Une zone contaminée peut alors devenir polluée, générant ainsi des risques pour la santé publique. La base de données française BASIAS a pour objectif d'identifier les anciens sites industriels potentiellement pollués dans le pays ; En 2019, elle en comptait près de 320 000. L'augmentation de la superficie de ces friches fragmente les habitats naturels. Outre la perte de biodiversité provoquée, la plupart des services écosystémiques en ressortent altérés (*e.g.* formation des sols, cycle de l'eau, ressources génétiques, pollinisation, *etc.*). C'est pourquoi les secteurs du réemploi et du recyclage ainsi que les techniques de gestion *in situ* doivent être développés. Ceci permettrait de réduire les volumes de déchets et par conséquent leur dangerosité.

Les processus de dépollution biologiques ont suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières décennies (Juwarkar *et al.*, 2010). Ces méthodes utilisent des organismes et/ou des composés biologiques pour le traitement des eaux, des sols contaminés et même de l'air. Globalement bien acceptées par le public, elles offrent également des avantages pour de

nombreuses considérations écologiques. En plus de leurs faibles coûts de mise en œuvre, ces techniques sont bien adaptées aux traitements *in situ* et sont souvent plus durables que les solutions d'assainissement classiques. Ainsi, la remise en état des friches se traduit par des avantages environnementaux, économiques et sociétaux plus importants.

La phytoremédiation comprend un ensemble de techniques faisant intervenir les plantes dans des opérations d'assainissement du sol pour éliminer et/ou contrôler les contaminations. Plus spécifiquement destinée à la gestion des pollutions inorganiques, la phytostabilisation consiste à mettre en place une couverture végétale pour réduire les flux de polluants vers les milieux environnants. La phytostabilisation vise essentiellement à réduire la biodisponibilité des métaux, concept défini comme étant "le degré auquel les polluants présents dans le sol peuvent être absorbés ou métabolisés par un récepteur humain ou écologique, ou être disponibles pour interaction avec des systèmes biologiques" (ISO17402:2008). La compréhension des interactions entre les propriétés du sol, les plantes ainsi que la microflore permet de mettre en évidence les processus biogéochimiques se mettant en œuvre dans les substrats marginaux que constituent les sols de friches industrielles. Dans ce contexte, ces travaux de thèse visent à évaluer les potentialités de phytostabilisation pour la réhabilitation d'une friche industrielle d'ArcelorMittal localisée dans la Loire et servant de décharge pour le stockage de laitiers d'aciérie.

Les laitiers sont des matières minérales issues d'activités anthropiques et sont particulièrement riches en métaux (présents à l'état de métal, oxyde ou hydroxyde). Pendant des décennies, ces matériaux ont été largement stockés sous la forme de terrils et constituent désormais des nuisances potentielles pour l'environnement et la santé publique. La faisabilité d'une phytostabilisation et l'efficacité d'une bioaugmentation pour gérer les dépôts de laitiers d'acier sont particulièrement abordées dans ce travail. Ce substrat étant a priori dépourvu de vie, une décharge de laitier d'acier constitue un excellent terrain d'étude pour appréhender les processus conduisant à la mise en place d'un écosystème durable.

## Foreword

Human activities change our environment at many scales. The exploitation of resources, from extraction to consumption, affects ecosystems. These anthropogenic activities invariably generate wastes. According to the French code of the environment, "Is considered as waste any residue of a process of production, processing or use, any substance, material, product [...] that its holder intends abandoned." (Article L.541-1-1). Worldwide, all types of waste (industrial, agricultural, household, *etc.*) have common trends: the volumes produced and existing ones are increasing. Estimations show that in the future 30 years, global wastes volumes produced will raise of 70% (Kaza *et al.*, 2018).

The World Bank estimated that industries reach 12.7 kg of waste per day for each world inhabitant, generating 18 times more wastes than households. Furthermore, the costs of handling waste for disposal or storage have also increased, limiting municipalities to manage their effluents and landfills. A large part of the industrial wastes are dangerous (*e.g.* asbestos, radioactive substances, solvents, hydrocarbons, slags, *etc.*). Particularly difficult to treat, they are also considered as toxic for environment. Most often, those unmanaged wastes induce contamination of ecosystems. A contaminated area can then become polluted, thus generating risks for public health. The BASIAS French database identifies and reports all potentially polluted sites in the country, reaching nearly 320,000 in 2019. Increasing wasteland areas disconnect natural habitats. Beside the loss of biodiversity caused, most ecosystem services are impaired (*e.g.* soils formation, water cycling, genetic resources, pollination, *etc.*). That is why recycling and *in situ* management techniques have to be developed in order to decrease volumes of wastes and their dangerousness.

Bioremediation processes attracted a lot of interest in the past decades (Juwarkar *et al.*, 2010). These methods employ all kinds of organisms and biological compounds for the treatment of contaminated waters and soils. Globally well accepted by public, they also provide ecological benefits. In addition of their low implementation costs, those *in situ* techniques are more sustainable than conventional remediation alternatives. In that way, rehabilitation of wastelands results in greater environmental, economic and societal benefits.

Phytoremediation includes a set of techniques involving plants in soil remediation operations to eliminate and/or control contaminations. More specifically indicated for inorganic pollution

management, phytostabilization implements a vegetation cover in order to reduce pollutants flows to surrounding environments. Phytostabilization basically aims at decreasing metals bioavailability, defined as being "the degree to which chemicals in the soil can be absorbed or metabolized by a human or ecological receptor, or be available for interaction with biological systems" (ISO17402: 2008). Understanding interactions between soil properties, plants and microflora highlight biogeochemical processes occurring in marginal substrates. In that context, this thesis works aims at evaluate phytostabilization potentialities for the rehabilitation of an ArcelorMittal toxic industrial wasteland located in Loire and composed of steel slags.

Slags are artificial mineral materials particularly rich in metals (present in the form of metal, oxide or hydroxide). For decades, these materials have been largely stored in the form of slag heaps and now constitute a potential nuisance for the environment and public health. The feasibility of phytostabilization and the effectiveness of bioaugmentation to manage steel slags deposits are particularly addressed in this work. Since its substrate is *a priori* devoid of life, a steel slag wasteland is a great case study for field implementation of a sustainable ecosystem.

# **Chapitre 1. Pollution inorganique et phytostabilisation**

## **1.1. La pollution inorganique**

### *a) Origines des contaminations métalliques*

**Sources naturelles**

**Sources anthropiques**

### *b) Spéciation des ETs dans les sols*

**Définition du milieu sol**

**Spéciation chimique et transferts dans les sols**

### *c) Biodisponibilité des ETs, essentialité et toxicité*

## **1.2. Le phytomanagement comme traitement**

### *a) Description des principes*

**Avantages par rapport aux méthodes conventionnelles**

**Phytomanagement de la pollution inorganique**

**Enjeux d'un procédé de phytostabilisation**

### *b) Composantes d'un phytomanagement*

**Espèces végétales à semer**

**Amendement et nutrition des plantes**

**Micro-organismes et interactions avec les végétaux**

## **1.3. Le programme PHYSAFIMM**

### *a) Objectifs et méthodologie*

### *b) Résultats et perspectives*

# **Chapitre 1 : Pollution inorganique et phytostabilisation**

Pollution vient du latin *polluere* (*por-*, « salir » et *-luo*, « baigner »). La législation qualifie la pollution comme étant la contamination d'un milieu par un agent polluant au-delà d'une norme, seuil, loi ou hypothèse. On distingue deux types de pollution : celles diffuses, qui surviennent sur des zones très étendues et concernent essentiellement l'atmosphère, et celles issues de contaminations ponctuelles, qui prennent leur origine de sources locales et concernent essentiellement la pédosphère et les aquifères associés. En France, le premier texte de loi traitant du sujet de la pollution date de 1964. La pollution inorganique apparaît donc comme une préoccupation récente. Pourtant, le développement de nos civilisations est étroitement lié aux métaux : monnaies, armements, transports et industries sont autant d'exemples en attestant. Ainsi, les activités anthropiques sont depuis longtemps responsables de rejets d'éléments métalliques ou métalloïdes dans l'environnement. Or, la plupart de ces éléments sont potentiellement toxiques dès lors qu'ils dépassent une certaine concentration. Les sites et sols qu'ils polluent constituent donc des menaces, autant pour la santé publique que pour les écosystèmes. Les techniques de dépollution conventionnelles, en plus d'être très onéreuses car souvent énergivores, ne sont pas toujours durables. L'alternative à ces méthodes pourrait se trouver dans la réhabilitation biologique. De par sa nature résiliente, son faible coût de mise en œuvre et ses atouts écologiques, le phytomanagement apparaît comme une solution d'intérêt.

## **1.1. La pollution inorganique**

### *a) Origines des contaminations inorganiques*

#### **Sources naturelles**

Les métaux sont issus de la croûte terrestre. C'est l'érosion et l'altération de la roche-mère qui conditionnent la formation des sols. Couplés à des phénomènes biologiques, les processus géochimiques conduisent à la différenciation des sols. Un cycle biogéochimique de différenciation de sols est de l'ordre de plusieurs milliers d'années et

dépend fortement des propriétés de la roche-mère. La présence naturelle d'éléments traces (ETs) potentiellement toxiques dans les milieux prend son origine dans des phénomènes géologiques : soit les roches-mères sont naturellement riches en métaux (telles que les roches ultrabasiques chargées de Cr ou de Ni), soit les métaux forment des anomalies géochimiques. Ce sont des formations dont la composition est différente du fond géochimique naturel et donc de la roche-mère locale. Elles se sont formées par le mouvement de fluides circulant dans les fractures de la croûte terrestre. Une partie des métaux rencontrés par ces flux sont mis en solution, concentrés et transportés loin de leur point de départ. Ainsi, l'or d'un gisement à 20 ppm est 4000 fois plus concentré que dans la moyenne de la croûte terrestre (0,005 ppm) (Richards et McDougall, 1990). Lorsqu'elles ne sont pas exploitées, ces concentrations métallifères sont recouvertes de terrains les isolant de la surface de la Terre. Mais sous l'effet de l'érosion, l'intégrité de ces terrains peut se dégrader : selon les estimations, les sols s'érodent en moyenne 20 à 100 fois plus vite qu'ils ne se renouvellent (Cuff et Goudie, 2009). La texture d'un sol conditionne sa vulnérabilité à l'érosion, mais c'est le climat et la topographie qui déterminent la part d'érosion due à l'éolien ou aux processus hydriques. Ces processus d'altération exposent les minéraux à des conditions différentes de celles de leur formation, conduisant à la dispersion des ETs contenus dans les roches. Les ETs ainsi mis en circulation se répartissent dans tous les compartiments des écosystèmes : sols, sédiments, eaux de surface, océans et atmosphère. Le transfert des ETs de la roche vers les sols s'accompagne d'une dilution dont le taux dépend du métal considéré, du climat, des propriétés de la roche émettrice et de celles du sol récepteur. Les sols humiques ou argileux ont par exemple une forte capacité d'accumulation en métaux. Sous l'effet du lessivage, certains horizons du sol peuvent ainsi recevoir les ETs provenant d'horizons dits éluviés. La différenciation des sols en contact plus ou moins étroit avec des anomalies géochimiques est la principale source de contamination métallique naturelle des sols. D'autres sources de contaminations naturelles existent, mais leur contribution est plus faible que le cycle précédemment décrit.

Ces autres sources prennent leur origine dans les émissions atmosphériques naturelles d'ETs. Il s'agit souvent de pollutions diffuses. Dans l'air, les ETs sont soit adsorbés aux

particules soit absorbés dans les eaux de précipitations. Ils rejoignent donc inévitablement les différents compartiments du sol. Parmi les sources naturelles d'apport en ETs dans l'atmosphère, on peut distinguer par ordre d'importance : l'érosion éolienne, les volcans, les feux de forêts et les embruns marins. L'érosion éolienne est très prononcée dans les régions désertiques et constitue la principale source d'émission atmosphérique d'ETs à l'échelle mondiale (Nriagu, 1989). A cette échelle, il est cependant difficile de distinguer les particules atmosphériques d'origine naturelle de celles d'origine anthropique (Rauch et Pacyna, 2009). Les volcans concentrent localement les métaux de la croûte terrestre à sa surface. Chaque année, 50 à 70 éruptions volcaniques ont lieu dans le monde. Ces éruptions émettent de la lave et des gaz volcaniques chargés en ETs. Les roches volcaniques résultant des coulées de lave sont souvent riches en ETs. Les fumerolles et gaz volcaniques constituent la deuxième source naturelle d'émission d'ETs dans l'atmosphère. Pyle et Mather (2003) estiment que les volcans en activité pourraient être responsables de jusqu'à 40% des émissions atmosphériques naturelles de Hg. A titre illustratif et selon des estimations plus récentes, l'Etna rejetterait chaque année 31t d'As, 13t de Cd, 63t de Cr, 240t de Cu, 30t de Ni, 31t de Pb, 39t de Ti et 90t de Zn dans l'atmosphère (Calabrese *et al.*, 2011). Les cycles biogéochimiques régis par les interactions entre plantes et sols peuvent remobiliser naturellement certains ETs. En effet, les plantes absorbent les métaux présents dans le sol et les redéposent en surface en alimentant la litière. Ainsi dans certaines régions, les feux de forêt peuvent être responsables de fortes émissions atmosphériques d'ETs (Yamasoe *et al.*, 2000 ; Breulmann *et al.*, 2002). Les embruns marins peuvent également être à l'origine de quelques apports atmosphériques en As, Pb, Ni, Cu, Cd, Zn (Witt *et al.*, 2010). Ces flux naturels font partie des cycles des métaux dans l'environnement, mais la perturbation de ces cycles par les activités humaines reste difficilement quantifiable. Ainsi, la part d'ETs présents dans les milieux et liée aux activités anthropiques se doit d'être décrite.



## Sources anthropiques

Comparativement aux sources d'origines naturelles, les contaminations métalliques résultant des activités humaines interviennent à des échelles de temps bien plus petites. Suvarapu et Baek (2017) ont compilé les résultats d'études traitant de la pollution atmosphérique en ETs en divers point du globe depuis 2006. Ils concluent que les principales sources émettrices d'ETs dans l'atmosphère sont les particules mises en suspension par l'érosion éolienne, les procédés industriels au sens large, la combustion de charbon et le trafic routier. L'Asie était responsable de 59% des émissions atmosphériques mondiales d'ETs en 2012. La Chine, le Chili, l'Inde, la Russie et les Etats-Unis sont actuellement les principaux pays émetteurs d'ETs dans l'atmosphère (Zhu *et al.*, 2020). Selon les estimations de Han *et al.* (2002), les apports en Pb, Hg et Cd anthropiques dans la pédosphère ont drastiquement augmenté depuis l'essor industriel du XX<sup>ème</sup> siècle. Klee et Graedel (2004) ont estimé pour chaque élément le rapport des flux anthropiques sur ceux naturels (Figure 1). Par exemple, la mobilisation anthropique du Cr est 1000 fois supérieure à sa mobilisation naturelle. Inversement, celle du Ca est estimée comme étant 1000 fois moins élevée que celle issue de ses flux naturels. Parmi les sources anthropiques d'apport en ETs dans les milieux, on peut distinguer ceux d'origine industrielle comme étant les plus importants : les exploitations minières et les usines de transformation de métaux. Les travaux miniers mettent à nu ou remontent en surface les roches contenant les gisements de métaux. L'utilisation d'explosifs crée des fissures dans des zones auparavant imperméables, ce qui favorise le contact entre eaux souterraines et contaminants éventuels. Le broyage des minerais produit de fines particules riches en métaux pouvant rejoindre l'atmosphère. De plus, une exploitation minière nécessite l'installation de carrières et terrils destinés à stocker les remblais et déchets miniers (Lottermoser, 2010 ; Csavina *et al.*, 2012). Les ETs s'intègrent naturellement à des centaines de minéraux, dont les plus communs sont les carbonates, les sulfures ou les sulfates. Etant donné que le soufre se complexe avec de nombreux éléments, il est considéré comme le principal vecteur de transport des métaux. Les eaux de mines en contact avec les minerais se chargent donc en acide sulfurique et les rejets miniers qui en résultent sont à la fois chargés d'ETs et très acides. Nordstrom *et al.* (2000) ont identifié

des rejets miniers comme étant les eaux les plus acides de la surface de la Terre (pH de - 3,6). Les industries transformatrices de métaux, telles que les usines sidérurgiques, sont aussi à l'origine de fortes pollutions métalliques. Lorsqu'ils ne font pas directement l'objet d'une valorisation ou d'une gestion, ces déchets terminent souvent en décharges. Les terrils sidérurgiques, au même titre que les terrils miniers, sont des lieux de dépôt à ciel ouvert où sont stockés laitiers et scories. Contrairement aux déchets miniers, les coproduits sidérurgiques sont des substances extrêmement basiques et sont communément chargés en Cr, Mo, V, Cu, Ni, Pb, Al ou Zn (Roadcap *et al.*, 2005; Mayes *et al.*, 2008 ; Gomes *et al.*, 2016). Des traitements d'anticorrosion sont appliqués lors des procédés de recyclage de ferrailles. Il s'agit généralement de solutions organiques acides contenant Zn ou Al (Bradl 2005 ; Kirchgeorg *et al.*, 2018). Les eaux contaminées par ces divers déchets sidérurgiques ruissellent vers les eaux de surface ou peuvent rejoindre une éventuelle nappe souterraine. Zhu *et al.* (2020) estiment que la fusion de métaux non ferreux est responsable de 51 à 77% des émissions atmosphériques mondiale d'As, Cd et Ni. Selon les même auteurs, la combustion de charbon dans les centrales thermiques serait responsable de 35 à 97% des émissions d'Hg, Cr, Mn, Co et Zn : dispersées par le vent, les plus petites particules peuvent se déposer jusqu'à plusieurs kilomètres des plus hautes cheminées émettrices. Les opérations de dragage, que cela soit pour gérer l'érosion côtière ou pour extraire les granulats marins utiles à la construction, pourraient aussi être responsables de la libération d'ETs contenus dans ces sédiments (Van Den Berg *et al.*, 2001 ; Cappunys *et al.*, 2006).

Les industries ne sont pas seules responsables des contaminations métalliques d'origine anthropique. Les Français produisent par exemple 500 kg de déchets ménagers par habitant et par an (ADEME, 2018). Environ 50% de ces déchets sont mis en décharge, 40% sont incinérés et 10% sont recyclés. Mais les décharges municipales n'isolent pas forcément efficacement les déchets des précipitations. Le travail que François (2004) a réalisé sur des déchets ayant séjourné dans une décharge a montré que la cinétique de lixiviation des ETs qu'ils contiennent, à savoir Zn, Ni, Cu, Pb et Cd, dépendait de leur étape de dégradation. Pour sa part, l'incinération de déchets ménagers génère des coproduits tels que les résidus de fumées d'incinération (REFIOM) ou les mâchefers

d'incinération (MIOM). Ce sont des résidus solides cristallisés concentrant une part d'ETs (Bartet, 2001 ; De Boom, 2007). Les trafics routiers sont également responsables de diverses émissions d'ETs. Les transports constituent la première source d'apport atmosphérique en Pb (Pacyna *et al.*, 2007). Cette tendance a cependant diminué depuis la généralisation de l'essence sans Pb. D'importantes teneurs en Cu, Sb, Zn, Cd sont néanmoins imputables aux trafics routiers car ces éléments sont présents dans les additifs aux disques de freins et aux pneus. Les pratiques agricoles peuvent quant à elles conduire à des apports en ETs localisés. Les boues de stations d'épuration, de par leur richesse en éléments nutritifs (N, P, K, *etc.*) et leur coût dérisoire, sont parfois employées en agriculture. Leurs épandages apportent également certains ETs (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) (Pichtel et Anderson, 1997 ; Cheng *et al.*, 2007) susceptibles d'être lessivés, absorbés par les plantes ou transportés vers les cours d'eau. L'utilisation de déjections d'animaux ayant consommé des aliments enrichis en ETs est aussi à prendre en considération (Sager, 2007). Les engrais issus de roches phosphatées contiennent naturellement As, Cd et/ou Pb qui sont susceptibles d'être relargués dans les sols lors de leur épandage ou accumulés par les plantes s'y développant (Mendes *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008). Certaines cultures spécifiques peuvent être soumises à d'avantage d'apports en ETs que d'autres. La viticulture emploie traditionnellement le traitement antifongique qu'est la bouillie bordelaise depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle. Son principe actif est Cu, apporté sous forme soluble et solide, permettant une efficacité immédiate et préventive, tout en limitant sa phytotoxicité pour les vignes. Certaines régions Françaises présentent des teneurs en Cu dans leur sol de plus de 200 ppm (Anatole-Monnier, 2014). D'autres contaminations peuvent être liées à l'utilisation d'amendements ou de pesticides riches en ETs (Nicholson *et al.*, 2003).

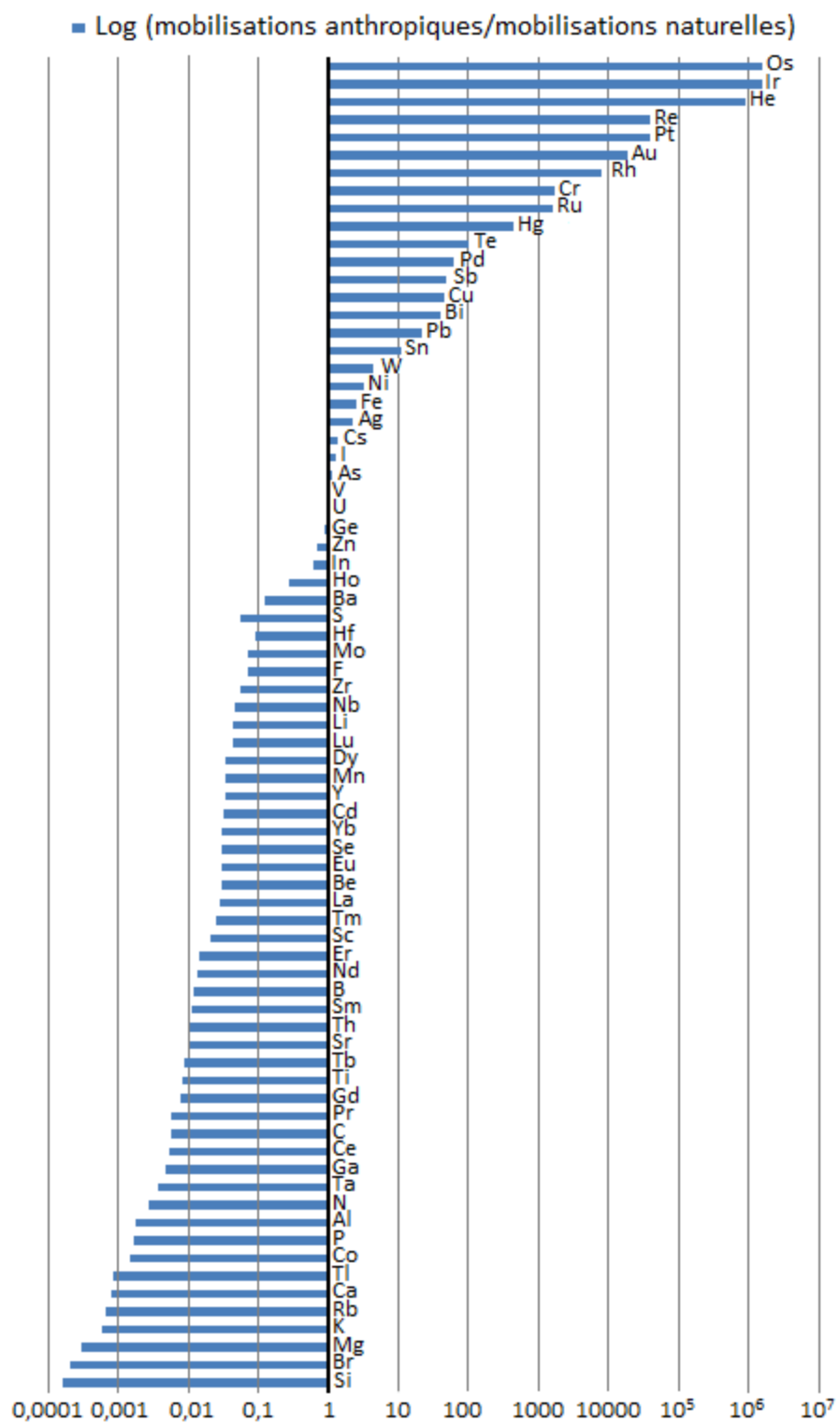


Figure 1 : Comparaison de la mobilisation anthropique de 77 éléments par rapport à leur mobilisation naturelle (Klee et Graedel, 2004)

## *b) Spéciation des ETs dans les sols*

### **Définitions du milieu sol**

Au sens le plus large, le sol est ce qui se trouve entre nos pieds et la croûte terrestre. Le terme de sol peut pourtant désigner des aspects très différents en fonction de la discipline dans laquelle on se place. Le géographe considère les sols en territoires tandis que le géologue les définit comme étant ce qui recouvre la roche-mère. Pour un agronome, il s'agit de la partie arable dans laquelle se développent les plantes alors que l'écologue le considère comme un écosystème à part entière. C'est la définition pédologique qui regroupe le plus de précisions : un sol est la formation de surface résultant de la transformation de la roche-mère sous l'influence de processus physiques, chimiques et biologiques, au contact de l'atmosphère et de la vie s'y développant.

La composition globale moyenne d'un sol comprend 50% de composés solides (45% de minéraux et 5% d'organiques), 25% de gaz et 25% de liquide. La fraction minérale prend son origine dans l'altération de la roche-mère et peut se caractériser par classes granulométriques. Les fractions fines regroupent les argiles ( $< 2 \mu\text{m}$ ) et les limons (de 2 à  $20 \mu\text{m}$ ) et les grossières sont les sables (de  $20 \mu\text{m}$  à 2 mm), les graviers (de 2 à 60 mm) et les cailloux ( $> 60 \text{ mm}$ ). La fraction minérale se compose principalement de silicates, de carbonates, d'oxydes et d'hydroxydes métalliques. Les composantes de la fraction organique se distinguent en fonction de leur stade de décomposition : la matière organique vivante (biomasse active), la fraîche (débris) et la stabilisée (humus). La fraction liquide se compose d'eau et d'éléments dissous. Cette phase est plus ou moins mobile en fonction de la taille et de la connectivité des pores qu'elle occupe. L'eau gravitaire (libre) circule dans les macroporosités, l'eau capillaire (pendulaire) occupe les mésoporosités et l'eau pelliculaire (liée) s'adsorbe fortement aux particules solides, occupant les microporosités. L'eau capillaire correspond à la réserve utile d'un sol : c'est la fraction d'eau interagissant avec les plantes et les organismes du sol. L'air du sol est en contact avec l'atmosphère et occupe les pores du sol qui ne sont pas occupés par l'eau. Sa distribution conditionne le potentiel rédox d'un sol. Les fractions liquides et gazeuses

sont fortement dépendantes de la texture d'un sol. Un sol argileux disposant d'une importante capacité à retenir l'eau dispose d'une réserve utile en eau élevée. A l'inverse, un sol sableux présente plus d'air dans ses pores, au détriment de l'eau qu'il peut y retenir. Un sol apparaît alors comme un milieu hétérogène résultant d'une multitude de processus biogéochimiques et où siègent des interactions complexes entre le vivant et le non vivant.

### **Spéciation chimique et transferts dans les sols**

Les ETs ne sont pas dégradables et persistent dans l'environnement. Leurs formes chimiques sont cependant sujettes à des changements gouvernant leur transfert dans les différents compartiments du sol. Ainsi, l'impact des métaux sur l'environnement est étroitement lié à la forme sous laquelle le métal se présente, c'est-à-dire à sa spéciation. Par ce phénomène de spéciation, le contenu total d'un métal se répartit dans la phase solide ou liquide d'un sol. Cette partition est influencée en premier lieu par le pH du sol et son potentiel rédox mais aussi par sa teneur en matière organique et les surfaces de sorption qu'il renferme (Naidu and Bolan, 2008). A l'état ionique, les ETs peuvent être en solution sous forme de cations libres ou complexés avec d'autres ions. De manière générale, la spéciation chimique permet de définir les formes atomiques ou moléculaires prises par un élément. La forme atomique d'un élément correspond à son degré d'oxydation, c'est-à-dire son état électronique dans une espèce chimique. Le degré d'oxydation d'une molécule est nul (*e.g.*  $\text{dox. (MoS}_2\text{)} = 0$  ;  $\text{dox. (ZnCO}_3\text{)} = 0$ ). Par définition, il est également nul dans les corps simples élémentaires que sont les formes métalliques (*e.g.*  $\text{dox. (Cu)} = 0$  ;  $\text{dox. (W)} = 0$ ). Dans le cas des ions, il est égal à la somme des charges portées par celui-ci. Par exemple dans le cas des ions monoatomiques :  $\text{dox. (Hg}^+\text{)} = 1$  (noté Hg(I)) ;  $\text{dox. (Cr}^{3+}\text{)} = 3$  (noté Cr(III)). Pour les ions polyatomiques, en sachant que O est généralement à un degré d'oxydation -2, on a par exemple :  $\text{dox. (CrO}_4^{2-}\text{)} = -2 \times 4 + \text{dox. (Cr)}_{(\text{CrO}_4^{2-})} = -2$  alors  $\text{dox. (Cr)}_{(\text{CrO}_4^{2-})} = 6$  (noté Cr(VI)). Le Cr(VI) est réputé très soluble tandis que le Cr(III) ne l'est que très peu. Ceci indique que la spéciation atomique des ETs joue un rôle essentiel sur leur capacité à se transférer d'une phase du sol à l'autre.

La forme moléculaire décrit quant à elle les complexes qu'un élément forme avec les autres composants d'un milieu. En fonction de leur état d'oxydation, les ions se complexent différemment avec les ligands présents dans leur environnement. En contexte alcalin par exemple, les ions phosphates ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) s'associent préférentiellement aux ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) pour donner des minéraux de la famille des apatites [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$ ]. La spéciation est donc en relation directe avec la solubilité d'un élément dans un système. Mais l'aptitude d'un ET à transiter dans les compartiments du sol au gré des transformations chimiques qu'il subit ne dépend pas uniquement de cette solubilité. Lorsqu'ils ne sont pas à l'état métallique, les ETs peuvent se fixer aux argiles ou à la matière organique par liaison ionique ou encore s'adsorber aux particules colloïdales d'un sol formant le complexe argilo-humique. Participant au phénomène de pédogénèse, ce complexe se trouve dans les agrégats constitutifs du sol. Il s'agit de l'association de colloïdes organiques et inorganiques chargés négativement. Les ions minéraux sous forme cationique s'y lient, permettant aux anions se s'y fixer à leur tour. Le pH joue un rôle clé sur la capacité d'un ET à se mouvoir dans un sol puisqu'il conditionne la compétition entre ions  $\text{H}^+$  et cations minéraux pour se lier au complexe argilo-humique. La spéciation chimique d'un élément dans une nature de sol donnée renseigne donc sur sa mobilité, c'est-à-dire sa capacité à migrer d'un compartiment du sol vers un autre. La faible mobilité d'un ET s'explique par le fait que sa forme moléculaire est stable. Un ET présentant une mobilité nulle est en fait piégé à l'intérieur de réseaux cristallins. Un ET se trouvant à l'état précipité, c'est-à-dire sous la forme d'un sel dans la solution de sol, est faiblement mobile. De moyennement à peu mobile, il est adsorbé à l'état de complexes et retenu par des forces de liaison plus ou moins importantes. Un ET très mobile est sous forme dissoute à l'état libre ou complexé (Calvet, 2003).

### *c) Biodisponibilité des ETs, essentialité et toxicité*

La teneur totale en ETs d'un milieu renseigne sur le danger global qu'il peut représenter mais n'indique qu'une concentration maximale mobilisable. La norme ISO17402 (2008) définit la biodisponibilité comme étant « *le degré selon lequel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées ou métabolisées par un récepteur humain ou*

*écologique, ou être disponibles pour une interaction avec des systèmes biologiques* ». La biodisponibilité d'un élément renseigne donc sur son aptitude à passer d'un compartiment du sol vers un organisme. Ce transfert se fait le plus souvent par l'intermédiaire de la solution du sol considéré et dépend donc de la mobilité de l'ET dans ce sol (cf. 2.1.b) § 2.). La toxicité d'une substance est sa capacité à provoquer des effets néfastes sur un organisme. Considérer l'abondance et la mobilité d'un ET dans un milieu informe donc sur sa toxicité potentielle. Dans les systèmes biologiques, les ETs affectent la plupart des composants cellulaires, perturbent le fonctionnement d'une multitude d'enzymes et provoquent des stress oxydatifs conduisant à une dégradation de l'ADN et des protéines. Ce large spectre d'actions a conduit à classer plusieurs ET comme cancérogènes (Tchounwou *et al.*, 2012). Certains ETs peuvent néanmoins se révéler plus toxiques que d'autres et ce même à des concentrations identiques. De nombreux métaux sont en effet des micronutriments essentiels impliqués dans diverses voies métaboliques (*e.g.* Mn, Zn, Ni, Mo, *etc.*). Apparus au début de l'évolution, les hèmes sont des cofacteurs contenant un atome métallique jouant des rôles clés pour le vivant. Dans le métabolisme végétal, ils sont impliqués dans la respiration, la photosynthèse ou la fixation d'azote (Outten et Teil, 2009). Waldron *et al.* (2009) ont étudié comment près d'un quart des fonctions enzymatiques dépendent du métal qu'elles contiennent (*e.g.* métalloprotéines et métalloenzymes). La toxicité de ces ETs essentiels n'est donc avérée qu'à des doses excessives. Ceux qui n'ont pas de fonction physiologique peuvent être considérés comme systématiquement toxiques (*e.g.* Hg, Pb, Cd). Le cas de l'Al, second métal le plus abondant de la croûte terrestre, peut également être cité car aucune fonction physiologique ne lui est attribuée à ce jour (Exley, 2003 et 2016). De nombreuses études ont porté sur sa phytotoxicité dans les sols acides (pH < 5,0), où l'on a constaté que son espèce toxique  $Al^{3+}$  diminue la production des cultures, perturbe la morphologie racinaire, l'expansion des feuilles et l'absorption des nutriments (Foy et al, 1978 ; Kidd et al, 2000 ; Seguel et al, 2013). Les études portant sur sa toxicité dans les sols alcalins (pH > 9,0) conduisent à des conclusions plus contrastées. Ainsi, la toxicité des espèces d'aluminates reste incertaine (Kopittke *et al.*, 2004 et 2016) même si des effets rhizotoxiques ont pu être observés (Stass *et al.*, 2006 ; Brautignan *et al.*, 2012). Certains ETs tels que Hg et Pb sont encore plus toxiques en adoptant une forme moléculaire



organique (methyl-mercure et plomb-tétraéthyle) qui les rend plus assimilables et donc plus biodisponibles. D'autres encore peuvent induire des effets néfastes lorsqu'ils se trouvent dans une certaine forme atomique. C'est le cas du Fe, du Cu ou encore du Cr. Bien qu'inoffensifs sous les formes  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Cu}^{3+}$ , les espèces  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  sont très réductrices. Concernant le Cr, son essentialité n'a été trouvée que dans son état trivalent (Mendel, 2005 ; Pechova et Pavlata, 2007) alors que son état hexavalent est considéré comme hautement mutagène et carcinogène (Koedrith *et al.*, 2013). La toxicité d'un ET peut aussi dépendre des êtres vivants récepteurs et de leur écologie : même s'ils appartiennent à la même famille chimique, Mo et W interagissent différemment avec les organismes d'un milieu. Bien que Mo soit essentiel dans de nombreux taxons biologiques, le W n'est essentiel que pour une gamme limitée de bactéries (Da Silva and Williams, 2001 et Zoroddu *et al.*, 2018).

Après avoir passé en revue les différentes sources de contaminations anthropiques et naturelles d'ETs dans les environnements, nous allons nous intéresser aux procédés de gestion de ces pollutions métalliques et en particulier les méthodes de dépollution biologiques que regroupe le phytomanagement.

## 1.2. Le phytomanagement comme traitement

### *a) Description des principes*

#### **Avantages par rapport aux méthodes conventionnelles**

À l'échelle de l'Union Européenne, le nombre de sites pollués a été estimé à 2,5 millions et 10% nécessiteraient une action de dépollution urgente (Kumpiene *et al.*, 2014). Une contamination métallique serait impliquée dans 40% des sites pollués européens (Mench *et al.*, 2010). Approximativement 318000 sites industriels sont identifiés comme susceptibles d'engendrer une pollution de l'environnement en France [Inventaire historique des sites activités de service (BASIAS), 2019]. Le coût de gestion de ces sites est estimé à 6 milliards d'euros par an pour l'Europe (Panagos *et al.*, 2013). En plus

d'être coûteuses, les technologies classiques d'assainissement des sols sont souvent destructrices et ne sont pas toujours durables (*e.g.* procédés thermiques, solidification et stabilisation, rinçage des sols, électrocinétique, réduction/oxydation chimique, lavage des sols, incinération, vitrification, excavation/extraction, enfouissement et élimination) (Meuser, 2012, Yao *et al.*, 2012). Depuis leur émergence dans les années 90, les phytotechnologies regroupent des approches durables faisant intervenir les végétaux dans des opérations de gestion des sols pollués afin de les restaurer écologiquement tout en éliminant ou en contrôlant leurs contaminants. Peu coûteuses, ces techniques sont applicables aussi bien pour la gestion de pollutions d'origine organique qu'inorganique et se révèlent très compétitives du fait que le traitement d'une tonne de sol ne coûte qu'entre 10 et 40\$ (Mulligan *et al.*, 2001). Le tableau I décrit les principales stratégies des phytotechnologies les plus couramment déployées pour la gestion de sites pollués. De nombreuses recherches se sont concentrées sur la gestion de la pollution inorganique de matrices faiblement à moyennement contaminées tels que les sols, sédiments, déchets solides ou encore les eaux. Les techniques de phytomanagement *in situ* sont particulièrement adaptées dans le cas de vastes zones à traiter, si des fonctions biologiques liées à la qualité du sol sont recherchées, pour lutter contre l'artificialisation des sols, recouvrer des services écosystémiques ou si les contraintes budgétaires sont trop importantes (Cundy *et al.*, 2016).

**Tableau I:** Phytotechnologies les plus fréquemment utilisées (Ibañez *et al.*, 201)

Phytomanagement de la pollu	<i>Phytotechnology</i>	<i>Application</i>	<i>Mechanism</i>	<i>Description</i>
	Phytoextraction/ Phytoaccumulation	Soil/water	Accumulation/ Hyperaccumulation	Concentration of pollutants in harvestable parts of plants (mainly aerial parts)
	Phytostabilization	Soil/water	Sorption, precipitation, complexation	Reduction of contaminants' mobility and prevention of their dispersion
	Phytovolatilization	Soil/water	Elimination via transpiration	Conversion of contaminants into volatile forms
	Phytotransformation/ Phytodegradation	Soil/water	Transformation; biodegradation; mineralization	Partial transformation and/or degradation of pollutants to less toxic or non-toxic by-products
	Phytofiltration/ Rhizofiltration	Water	Sorption/absorption	Pollutants uptake from aquatic environments
	Rhizodegradation/ Rhizoremediation/ Phytostimulation	Soil	Rhizosphere accumulation/ biodegradation	Degradation and/or stabilization by rhizospheric microorganisms, stimulated by plant exudates
	Phytodesalination	Soil	Reduction of salt levels	Removal of salts using halophytes

## **tion inorganique**

Le principal mode d'action d'un phytomanagement pour réhabiliter un site pollué aux ETs est d'agir sur leur biodisponibilité (cf. 2.1.c) § 1.). Les deux principales stratégies de phytomanagement d'une pollution inorganique sont la phytoextraction et la phytostabilisation. La phytoextraction vise à concentrer les ETs dans les parties récoltables des plantes installées. Les métaux d'intérêt économique ainsi extraits peuvent être récupérés, revalorisant par la même occasion des sols impropres aux cultures à vocation alimentaire. Ce principe a donné naissance au phytomining (ou agromine), qui donne des résultats prometteurs concernant la récupération du Ni de sols serpentiniques naturels (Echevarria *et al.*, 2015) ou issus d'activités minières (Cerdeira-Perez *et al.*, 2019) et explore depuis 2000 la récupération d'autres métaux (*e.g.* Au, Co, Mn, Pd, Pt) (Brooks *et al.*, 1998 ; Sheoran *et al.*, 2009 ; Chaney *et al.*, 2004 et 2017). La phytostabilisation consiste quant à elle à réduire la biodisponibilité des ETs, en agissant notamment sur leur mobilité, de manière à diminuer leurs caractères écotoxicologiques (Cunningham et Berti, 2000 ; Mench *et al.*, 2010 ; Kidd *et al.*, 2015 ; Burges *et al.*, 2018).

### **Enjeux d'un procédé de phytostabilisation**

Les interfaces d'un site pollué aux ETs peuvent être le sous-sol, les nappes d'eau souterraines, les cours d'eau et l'air. La phytostabilisation est une option recourant à des plantes pour réduire la migration des polluants du réservoir contaminé vers les milieux qui l'environnent et les récepteurs biologiques qui en dépendent. Le couvert végétal permet de limiter les flux de manière active grâce à l'évapotranspiration renvoyant vers l'atmosphère une partie significative des eaux de précipitations et limite d'autant les transferts vers la nappe. Il agit également de façon passive en diminuant le ruissellement et en freinant l'air au-dessus du substrat contaminé (Bouchardon *et al.*, 2014). De la sorte, il diminue les transports de solutés vers les cours d'eau et des particules solides par transport éolien. L'efficacité de la phytostabilisation s'évalue par la capacité des espèces végétales sélectionnées à se développer sur le substrat et leur comportement vis-à-vis des métaux résiduels (adsorption et absorption racinaire, translocation dans les tissus aériens).

En effet, la phytostabilisation privilégie l'exclusion des ETs des organes aériens du végétal. En n'engendrant pas une concentration excessive en ETs dans les végétaux, la dispersion de la pollution provoquée par sénescence (chute des feuilles) ou par herbivorie (consommation des plantes par des animaux) est limitée. Les métaux n'étant pas dégradé dans l'environnement, ils peuvent en effet se transférer et s'accumuler le long des chaînes trophiques. Plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité de procédés de phytostabilisation pour réhabiliter d'anciens sites miniers, aussi bien par leurs aspects durables et écologiques, que par leurs faibles coûts de mise en œuvre (Mench *et al.*, 1999 ; Frérot *et al.*, 2006 ; Mendez et Maier, 2008 ; Vamerali *et al.*, 2010). Outre la prise en compte du climat local, de la géométrie des surfaces à phytostabiliser ou de la disponibilité des espèces vivantes sélectionnées, le procédé de phytostabilisation doit viser à diminuer la biodisponibilité en métaux pour les plantes semées. Le couvert végétal ne subissant pas ou peu les effets délétères des métaux n'en devient que plus vigoureux. Sa capacité à limiter les phénomènes d'érosion et d'infiltration ou de ruissellement des eaux est alors d'autant plus efficace. L'atteinte de ces objectifs nécessite d'adapter un certain nombre de composantes du projet au site d'étude, à la pollution inorganique qu'il renferme ainsi qu'à ses autres problématiques.

#### *b) Les composantes d'un phytomanagement*

Dès lors que les problématiques liées à un site contaminé aux ETs sont connues, l'élaboration d'un procédé de phytomanagement nécessite de choisir un certain nombre de paramètres et d'évaluer leur efficacité. Les composantes d'un phytomanagement regroupent les espèces végétales à employer (*e.g.* consortium d'espèces, densité de semis, *etc.*), les amendements (*e.g.* organique ou minéral, quantité à appliquer, *etc.*) et la dynamique microbienne recherchée, qu'elle soit fournie par l'amendement ou apportée par l'intermédiaire d'inoculations.

## Espèces végétales à semer

Même s'il convient d'en mesurer *a posteriori* les conséquences, l'obtention rapide d'une couverture végétale maximale est le premier objectif d'un phytomanagement. Il faut alors que les végétaux semés soient capables de se développer sur un substrat riche en contaminants inorganiques. Or les végétaux se montrent très dissemblables, à la fois dans leur tolérance et leurs capacité à absorber les ETs. Certaines plantes ont notamment développé la capacité d'exclure les ETs de leur métabolisme ou de tolérer leur accumulation (Baker, 1981). La phytoextraction requiert de choisir des espèces hyperaccumulatrices d'ETs tandis que la phytostabilisation implique qu'elles en accumulent un minimum. Outre ces différentes stratégies d'adaptation à la présence d'ETs dans leur milieu, les végétaux se classent en familles dont les fonctions dans leurs écosystèmes sont diverses.

En milieu naturel les espèces ne se distribuent pas au hasard mais se regroupent pour former des communautés caractéristiques représentatives de leurs écologies (Braun-Blanquet, 1964). Les stratégies développées par les plantes s'agencent selon le compromis entre l'acquisition rapide des ressources lorsqu'elles sont abondantes et leur conservation lorsqu'elles sont limitées. Ainsi, la diversité fonctionnelle d'un écosystème résulte de la coexistence entre des espèces végétales conservatives (taux de croissance lents, faible surface foliaire spécifique) et des espèces exploitatives (taux de croissance rapides, surface foliaire spécifique élevée). Les espèces végétales annuelles ou bisannuelles disposent globalement de stratégies exploitatives tandis que les vivaces sont généralement conservatives. La spécialisation des organismes vis à vis de ces stratégies fait intervenir des traits fonctionnels morphologiques (*e.g.* diamètre, surface racinaire spécifique, surface foliaire spécifique), physiologiques (*e.g.* quantité d'exsudats), chimiques (*e.g.* ratio C:N) (Bardgett *et al.*, 2014). Par exemple, les Poacées se développent par exemple en recouvrant les sols et disposent de systèmes racinaires très denses. Les espèces de Fabacées peuvent quant à elle fixer le N atmosphérique dans leurs tissus par l'intermédiaire d'une relation symbiotique avec des bactéries de genre *Rhizobium* : celles-ci sont hébergées dans la rhizosphère des Fabacées, où elles réalisent

des associations symbiotiques racinaires. Ainsi, les taxons rencontrés dans une communauté donnée présentent non seulement des exigences écologiques similaires mais entretiennent également souvent des relations de facilitation mutuelle (Padilla et Pugnaire, 2006 ; Brooker *et al.*, 2008). Au-delà des taxons choisis pour constituer l'assemblage de semences, il est indispensable de considérer les interactions, de synergie ou d'antagonisme, susceptibles de s'établir entre les espèces (Frérot *et al.* 2006). Les écosystèmes naturels se composent donc d'espèces aux fonctions et aux écologies complémentaires, les dotant de meilleures capacités que les monocultures en termes de résilience et d'adaptation aux hétérogénéités d'un milieu (Stachowicz *et al.*, 2008 ; Prieto *et al.*, 2015). Optimiser la durabilité d'un projet de phytomanagement nécessite donc de choisir une association d'espèces plutôt qu'une seule. L'assemblage de semences doit aussi être réfléchi en fonction des disponibilités locales en graines.

Les plantes invasives sont des espèces ayant acquis un avantage compétitif dans un nouveau territoire. Disposant d'une forte capacité de dispersion leur permettant de devenir localement dominantes, elles n'entrent pas dans les associations spécifiques existantes et peuvent être responsables de la perturbation d'un écosystème. Souvent colonisateurs primaires des milieux dégradés que sont les friches industrielles, ces plantes constituent la seconde cause de perte de biodiversité après la destruction et la fragmentation des habitats (Ernst *et al.*, 1998 ; D'Antonio et Chambers, 2006 ; Gaertner *et al.*, 2009). Un procédé de phytomanagement probant doit donc être capable de limiter la colonisation par ces espèces afin d'éviter leur dissémination vers les milieux environnants et de conserver un caractère durable. L'utilisation d'espèces tolérantes adaptées entre elles et aux conditions pédogéochimiques et climatiques du milieu est le premier critère d'un phytomanagement réussi. Pour se faire, des campagnes de bioprospection permettent de sélectionner des assemblages végétaux adaptés tant pour leur complémentarité fonctionnelle interspécifique que pour leur tolérance vis-à-vis des différentes contraintes du site à traiter. Mais garantir le succès de l'implantation d'une communauté végétale nécessite bien souvent de modifier les propriétés pédologiques du substrat à traiter.

## Amendement et nutrition des plantes

Outre leur niveau de contamination métallique variable, tant en termes de nature que de concentrations, les sols de sites contaminés aux ETs présentent souvent des propriétés pédologiques marginales. La colonisation de ces terrains par les plantes peut ainsi être limitée par plusieurs contraintes édaphiques telles que la richesse en éléments métalliques du substrat mais aussi son pH, sa structure, sa teneur en matière organique, en nutriments et leur biodisponibilité. La nutrition des plantes constitue en cela un défi dans ces milieux dégradés. Les macronutriments sont en effet indispensables au métabolisme végétal et diffèrent des micronutriments de par leur concentration dans les tissus végétaux. Les plus labiles, comme les ions Ca, K ou Cl, sont généralement des porteurs de charges et interviennent dans l'osmo-régulation cellulaire. Étant donné qu'il compose les acides nucléiques, protéines, phytohormones, *etc.*, N est un élément majeur pour les plantes. P est pour sa part un composant essentiel de l'ADN ou de l'ARN, il est aussi impliqué dans la biochimie de tous les organismes connus en tant que cofacteur jouant le rôle de vecteur énergétique, notamment via la formation d'ATP. Mg est quant à lui fortement impliqué dans le système photosynthétique car il entre dans la composition de la chlorophylle. Le tableau II présente les teneurs en nutriments nécessaires au développement optimal des plantes.

Les sols sont des ressources non renouvelables à l'échelle de temps humaine (Blum, 2005 ; Lal, 2015). Cela suppose que plutôt que d'apporter une couche supplémentaire de sol propre sur un sol contaminé pour favoriser la croissance des plantes, il est préférable d'apporter un amendement modifiant les propriétés pédologiques du sol à traiter. Dans le cas des technosols, dont la composition est essentiellement minérale, l'apport d'amendement peut permettre d'initier une pédogénèse. Les amendements peuvent être de nature minérale (*e.g.* sable, chaux, gypse, NPK, *etc.*) ou organique (*e.g.* BRF, biochar, tourbe, compost, boues de station d'épuration, *etc.*). Leurs modes d'action pour améliorer un sol sont très variés. Les amendements minéraux agissent directement sur la géochimie du substrat tandis que les amendements organiques la modifient progressivement au fur et à mesure qu'ils se dégradent et dispensent les nutriments qu'ils contiennent. La chaux

peut par exemple être utilisée pour corriger l'acidité d'un sol sans pour autant modifier son contenu en nutriments. Les engrais minéraux de type « NPK » n'ont quant à eux qu'un effet minime sur le pH mais apportent rapidement le N, le P et le K indispensables à la croissance végétale. La plupart des amendements organiques peuvent à la fois fournir des nutriments et modifier la structure d'un sol, c'est le cas du compost ou du fumier qui peuvent fortement améliorer la capacité d'un sol à retenir l'eau. La matière organique que ces amendements apportent peut aussi favoriser l'adsorption des métaux et ainsi limiter leur biodisponibilité. Le biochar est de la biomasse pyrolysée renfermant de nombreux sites de sorption susceptibles de séquestrer les ETs d'un sol. Cet amendement a été le sujet de nombreuses investigations récentes (Houben *et al.*, 2013 ; Forján *et al.*, 2016) bien que son emploi puisse induire le relargage d'ETs à mesure que le biochar se dégrade (Uchimiya *et al.*, 2011). De la même manière que pour les semences et dans un souci d'optimisation du procédé, l'amendement doit aussi être choisi en fonction de sa disponibilité locale. Les amendements apparaissent donc comme une composante clé à tout projet de phytomanagement car ils permettent d'orienter la pédologie d'un substrat. Ils peuvent également apporter des communautés de micro-organismes dont les fonctions font partie intégrante des processus biogéochimiques (Ros *et al.*, 2006 ; Saison *et al.*, 2006).

**Tableau II** : Concentrations moyennes en éléments dosés dans les parties aériennes sèches de plantes requises pour une croissance normale (Epstein, 1965 ; Epstein et Bloom, 2005 ; Brown *et al.*, 1987)

Élément	$\mu\text{mol.g}^{-1}$	$\text{mg.kg}^{-1}$
Ni	0,001	0,1
Cu	0,1	6
Zn	0,3	20
Mn	1,0	50
Fe	2,0	100
B	2,0	20
S	30	1000
P	60	2000
Mg	80	2000
Ca	125	5000
K	250	10000
N	1000	15000



## Micro-organismes et interactions avec les végétaux

Les sols renferment de grandes quantités de micro-organismes (*e.g.* bactéries, champignons, levures, *etc.*). Présents dans tout type de sols, ils jouent des rôles clés dans tout écosystème. Leurs fonctions écologiques (minéralisation de la matière organique, cycle de l'azote, agrégation des sols, *etc.*) modifient la disponibilité des éléments et les propriétés du sol qui les contient. Les microorganismes interagissent entre eux et co-évoluent avec les plantes, donnant naissance à des interactions pouvant être délétères (parasitisme), neutre (commensalisme) ou bénéfiques (mutualisme). Puisqu'ils jouent un rôle crucial dans l'absorption des nutriments, les micro-organismes constituent des moteurs pour le développement des plantes et les successions écologiques d'un milieu. De nombreux paramètres du sol peuvent favoriser l'adaptabilité ou l'acclimatation des espèces de micro-organismes. Leur adaptation est un processus rapide car leurs cycles de vie sont courts et qu'ils sont capables de libérer des plasmides pouvant se transférer aux autres membres d'une population (Sorensen *et al.*, 2005). La teneur élevée en ETs d'un sol constitue une pression de sélection drastique favorisant l'évolution de micro-organismes en leur permettant de s'adapter très spécifiquement à leur site indigène. Partant du constat que les traits fonctionnels de ces communautés peuvent notamment être utilisés dans des projets de réhabilitations, des études de bioprospection récentes ont permis de sélectionner des micro-organismes adaptés au traitement *in situ* de sols pollués aux ETs. Initialement appliqué au traitement des eaux usées en station d'épuration, l'emploi de micro-organismes pour dépolluer des sites contaminés aux ETs, aussi appelé bioaugmentation, est depuis peu le sujet de nombreuses études (Nannipieri *et al.*, 2003 ; Sprocati *et al.*, 2014 ; Berthelot *et al.*, 2016 ; Kidd *et al.*, 2017).

A l'état naturel, la grande majorité des plantes sont associées à des champignons dits mycorhiziens dans une interaction de mutualisme. Les hyphes de ces micro-organismes colonisent les racines des plantes pour interagir étroitement avec elles. Les mycorhizes sont le résultat de cette association : Le champignon favorise l'acquisition d'éléments minéraux pour la plante qui, en retour, lui fournit les photosynthétats qu'elle produit. On

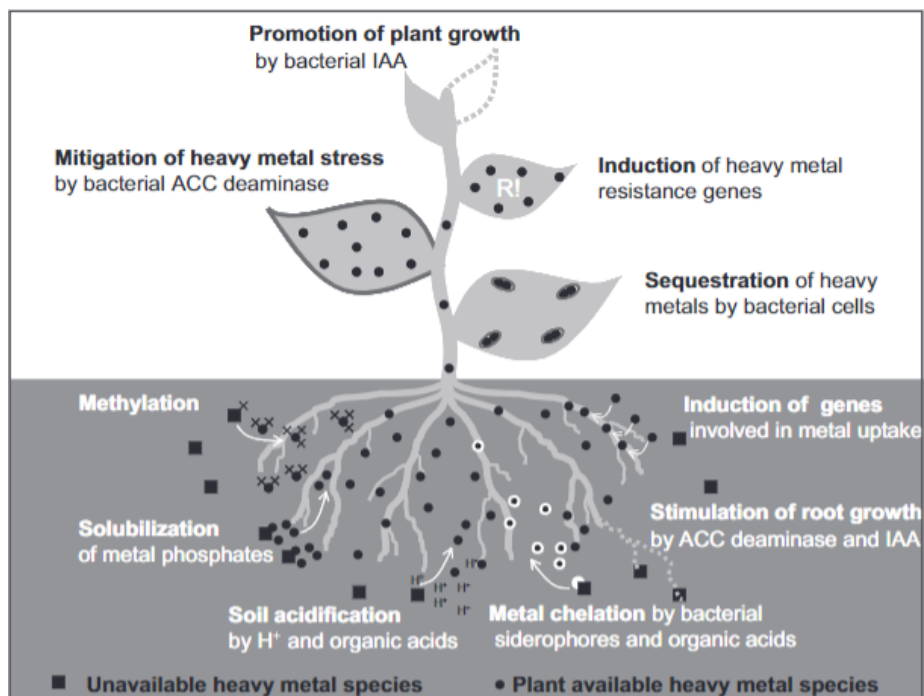
distingue deux principaux types de mycorhizes : les endomycorhizes et les ectomycorhizes. Les endomycorhizes sont les plus répandues et s'associent aux plantes herbacées et ligneuses. Parmi elles se trouvent les champignons mycorhiziens arbusculaires (Arbuscular Mychorizal Fungi : AMF). Très généralistes, leur apparition est concomitante à celle des premières plantes terrestres et ils colonisent aujourd'hui près de 80% d'entre elles (Pirozynski et Malloch, 1975). Les endomycorhizes, à la différence des ectomycorhizes, pénètrent les cellules végétales pour mieux interagir avec la plante hôte. La symbiose ectomycorhizienne concerne essentiellement les arbres qui abondent dans les forêts où les climats froids et secs limitent la décomposition (Steidinger *et al.*, 2019). L'inoculation de spores d'AMF est de plus en plus explorée en agriculture car elle permet d'abaisser les apports et donc les coûts en amendements. En effet, les mycorhizes augmentent significativement le volume de sol explorable par les racines des plantes, ce qui améliore l'absorption d'eau et d'éléments nutritifs par la végétation tout en structurant le sol (Rillig, 2004 ; Mathur *et al.*, 2007 ; Meier *et al.*, 2012). Cette amélioration de la qualité du sol diminue les risques de lessivage et augmente la rétention des éléments nutritifs. Les AMF permettent aux plantes de se développer dans des environnements minéraux relativement stressant, en les rendant moins vulnérable à la salinité ou la sécheresse. Il est communément admis que les plantes mycorhizées présentent des teneurs en P, N, Mg, K, Cu et Zn plus importantes que celles qui ne le sont pas (Marschner et Dell, 1994 ; Clark et Zeto, 2000). En plus d'une meilleure tolérance aux contraintes environnementales, les plantes hôtes d'AMF résistent mieux aux organismes pathogènes. Il a déjà été démontré que les AMF jouent un rôle positif dans certains projets de phytostabilisation comme de phytoextraction (Leung *et al.*, 2013 ; Ma *et al.*, 2019 ; Schneider *et al.*, 2016 ; Orłowska *et al.*, 2010, Firmin *et al.*, 2015). Certaines études ont également souligné que l'emploi d'AMF s'applique bien aux approches de phytostabilisation car ils peuvent immobiliser certains ETs dans leurs hyphes et ainsi limiter leur transport vers les parties aériennes du végétal (Zhang *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2016).

Les bactéries présentant des traits fonctionnels d'intérêt pour le développement des plantes sont appelées promotrices de croissance végétale (Plant Growth Promoting

Bacteria : PGPB). Ces micro-organismes se développent dans la rhizosphère des plantes mais peuvent aussi être intégrés dans les cellules végétales, il s'agit alors d'endophytes. Ces bactéries peuvent être apportées sous la forme de bioinoculants pour agir conjointement avec les plantes pour améliorer la disponibilité en éléments nutritifs d'un substrat. Certaines sont en effet capables de solubiliser le P minéral du sol ou encore de synthétiser des sidérophores pouvant se complexer au Fe et ainsi le rendre plus biodisponible (Hider *et al.*, 2010 ; Sharma *et al.*, 2013). Les bactéries peuvent également agir plus ou moins directement sur l'état d'oxydation de certains métaux, modifiant ainsi leur disponibilité, pouvant aller jusqu'à leur précipitation et présentant ainsi un fort intérêt en phytostabilisation (Macy *et al.*, 2000 ; Valls et Lorenzo, 2002 ; Gadd, 2004 ; Zahoor et Rehman, 2009 ; Garavaglia *et al.*, 2010). Inversement, la bioaugmentation a été largement expérimentée dans le cadre de projets de phytoextraction pour son potentiel à favoriser la captation d'ETs par les plantes en modifiant leur biodisponibilité dans les rhizosphères des végétaux (Sessitch *et al.*, 2013 ; Cycoń *et al.*, 2017 ; Ghasemi *et al.*, 2018). Néanmoins, la méta-analyse de Sessitch *et al.* (2013) a montré que les inoculants bactériens réussissent mieux à promouvoir la croissance des plantes et la production de biomasse (améliorant le rendement de métaux extraits du sol), plutôt que d'augmenter la concentration de métaux dans les organes aériens des végétaux. En effet, l'un des mécanismes de ces PGPB consiste en la synthèse de phytohormones induisant la croissance des plantes ou leur conférant une meilleure tolérance aux contraintes environnementales (Kudoyarova *et al.*, 2015). Jusqu'à récemment, la plupart des projets couplant phytoremediation et bioaugmentation se concentraient sur l'inoculation individuelle d'une souche bactérienne, qu'elle soit endophyte ou issue de la rhizosphère, mais des résultats prometteurs ont été obtenus avec l'apport de consortium de différentes souches de PGPB aux actions complémentaires, notamment en phytoextraction, et dont les principaux mécanismes d'action sont présentées dans la figure 2 (Benizri et Kidd, 2018). A titre d'exemple, Visioli *et al.* (2015) ont démontré que la co-inoculation de deux endophytes présentant la capacité de produire de l'IAA et disposant d'une activité d'ACC déaminase favorisait d'avantage la croissance végétale et la translocation de Ni qu'en les inoculants individuellement. De plus, dans un contexte de faible disponibilité en Phosphore, Emami *et al.* (2020) ont montré que l'effet d'une co-inoculation d'espèces de

bactéries endophytes et rhizosphériques fournissait de meilleur taux d'acquisition de nutriments (P, Fe, Zn), améliorait d'avantage la production de biomasse, la teneur en protéines et l'activité enzymatique (déhydrogénase et phosphatase) du blé (*Triticum aestivum* L.) que l'inoculation d'une bactérie endophytique ou rhizosphérique seule. Finalement, Moreira *et al.* (2016) ont démontré que la co-inoculation d'une AMF et de PGPB à une culture de Maïs dans des sols pollués aux métaux et destiné à la production d'énergie pouvaient présenter un fort intérêt d'application aux stratégies de phytomanagement.

Néanmoins, l'efficacité d'un inoculant employé dans le cadre d'une bioaugmentation dépend de nombreux facteurs en interaction, tels que les espèces végétales et microbiennes sélectionnées, les propriétés du sol, les éléments traces qu'il contient (mono- ou poly-métallique) et leurs concentrations. De plus, outre le fait qu'il a été constaté que les méthodes d'inoculation diffèrent grandement selon les études (inoculation de semences/plante/sol, fréquence et temps des événements d'inoculation, densités cellulaires bactériennes, *etc.*) et que ces aspects sont susceptibles d'influer sur l'observation d'un effet induit par les micro-organismes (Pereira *et al.*, 2015 ; Alvarez Lopez *et al.*, 2016b), les souches bactériennes ou fongiques inoculées ne sont pas nécessairement compatibles avec les espèces de plantes hôtes, celles-ci ne les ayant pas sélectionnés naturellement (Thijs *et al.* 2016). Enfin, la survie et la prolifération des micro-organismes introduits peuvent être affectées par la forte compétition auxquelles ces derniers sont soumis dans le sol (Benizri et Kidd, 2018).



**Figure 2** : Potentielles interactions plante-bactérie influençant l'accumulation d'éléments traces dans les plantes (Pilon-Smits, 2005 puis Benizri et Kidd, 2018)

L'élaboration d'une méthodologie de la phytostabilisation de friches industrielles et minières a fait l'objet d'un programme de recherche financé par l'ADEME. En lien étroit avec ces travaux de thèse, le programme PHYSAFIMM a permis l'obtention de résultats encourageants constituant une base solide à la poursuite des recherches sur ce sujet.

### 1.3. Le programme PHYSAFIMM

#### a) Objectifs et méthodologie

Le programme Physafimm (Bouchardon *et al.*, 2014) a défini une méthodologie de mise en œuvre et de suivi d'un procédé de phytostabilisation extrapolable à un ensemble de friches industrielles, métallurgiques ou minières. Conduit sur le site d'IFAM (cf. 1.2.b) § 2.), le projet proposait d'évaluer l'efficacité d'assemblages végétaux et d'amendements pour phytostabiliser son terroir sidérurgique tout en dressant le bilan du procédé employé. Implémenter une phytostabilisation sur laitier d'acier représente un véritable défi. Des études récentes ont évaluées le potentiel de ce procédé biologique pour la gestion de laitiers de Pb (Da Silva *et al.*, 2017), de Cu (Agnello *et al.*, 2018) ou de Zn (Luo *et al.*,

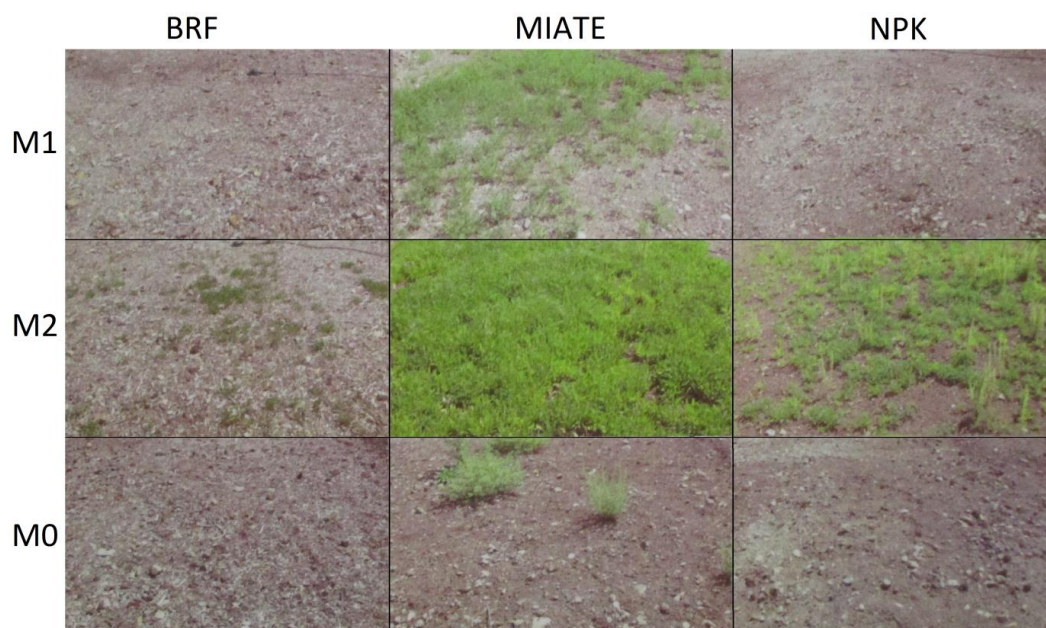
2020). Néanmoins, la phytostabilisation de laitiers d'acier consitute un domaine de recherche très peu renseigné. En effet, les laitiers contenus dans le terril d'IFAM sont très alcalins (pH proche de 12), présentent des teneurs élevées en Al, Cr, Cu, Ni, Mo, V, contiennent très peu de nutriments biodisponibles, disposent d'une très faible capacité à retenir l'eau et sont dépourvus de matière organique. Afin de mener le projet à bien, des parcelles expérimentales ont été installées sur le terril. Trois types d'amendements ont été testés : un amendement minéral, le NPK et deux amendements organiques : le BRF (Bois Raméal fragmenté) et le MIATE (Matériaux d'Intérêt Agronomique issu du Traitement des Eaux). Pour chacun de ces amendements, deux types de semis ont été appliqués aux parcelles. Les travaux de Remon *et al.* (2006) ont porté sur la végétation de plusieurs sites métallurgiques de la région stéphanoise. Ils ont mis en évidence l'existence d'associations caractéristiques et ont donné des pistes concernant l'assemblage d'espèces à semer. En effet, l'importance du choix d'associations phytosociologiques particulières n'est généralement que peu considéré dans les essais de phytostabilisation. Deux assemblages, notés M1 et M2 ont été testés : l'assemblage M1 correspond à un mélange classique d'espèces commerciales communes couramment utilisées pour la revégétalisation de friches et de talus routiers ; le semis M2 est un assemblage plus optimisé, enrichi en espèces souvent rencontrées sur les friches métallurgiques de la région. Une condition « contrôle », c'est à dire sans semis, a également été testée afin d'évaluer le potentiel de colonisation spontanée sur les parcelles différemment amendées. Outre la mesure des ETs foliaires des plantes installées, deux dispositifs ont permis d'évaluer les flux de contaminants en fonction des taux de recouvrement obtenus sur chacune des parcelles. Des lysimètres ont d'une part permis de quantifier les flux hydriques correspondant à l'infiltration des eaux dans le terril. D'autre part, l'installation d'un tunnel à vent a permis d'évaluer l'effet de la végétation sur le transport éolien de particules de laitier.

#### *b) Résultats et perspectives*

La figure 3 montre l'état des parcelles trois ans après le semis des graines. Le NPK ne permet une couverture proche de 40% qu'avec l'assemblage M2. Avec les autres semis, il

ne permet pas l'installation d'une végétation. Le BRF n'a permis aucun recouvrement significatif des parcelles. A l'inverse, le MIATE favorise grandement l'installation des espèces appartenant aux deux assemblages de graines. Le meilleur résultat de recouvrement a été obtenu avec le couple MIATE/M2, qui offre une couverture presque totale du substrat. Le couvert végétal obtenu présente également la plus grande richesse spécifique. De plus, l'apport de MIATE ou de BRF diminue la quantité de Cr, Mo et Ni en solution dans le substrat par comparaison avec l'apport en NPK. Ces amendements organiques contribuent aussi à réduire la teneur en ETs des organes aériens des plantes s'y développant. Le programme PHYSAFIMM a démontré qu'une végétalisation des terrils sidérurgiques était possible. Cela implique un travail suffisant du technosol, en apportant du MIATE sur une dizaine de centimètres, ainsi que l'utilisation d'un mélange d'espèces adaptées aux contraintes pédogéochimiques observées sur le terril. Le procédé adopté a également montré son efficacité pour limiter les transferts d'ETs tant vers le couvert végétal que vers les milieux environnants le site. Les parcelles les plus végétalisées annulent le transport éolien de particules et le bilan hydrologique a montré qu'elles permettaient de réduire significativement les eaux s'infiltrant dans le terril. La phytostabilisation apparaît donc comme une solution efficace pour la réhabilitation des terrils sidérurgiques. Malgré cela, les teneurs en Cr et Mo mesurés dans les tissus foliaires restent très élevées. De plus, l'hétérogénéité des couvertures végétales obtenues suggèrent que certains obstacles à la colonisation des plantes restent méconnus et donc non contrôlés. Les composantes du procédé de phytostabilisation doivent donc être développées, notamment en s'intéressant d'avantage aux interactions entre les plantes et les micro-organismes susceptibles de favoriser leurs croissances.





**Figure 3** : Photographies des 9 couples de Semis/Amendement des parcelles PHYSAFIMM, 3 ans après la préparation des parcelles et le semis des graines (échelle approximative : 5 cm = 5 m)

## References

- Richards, J.P. and McDougall, I. (1990)** – Geochronology of the Porgera gold deposit, Papua New Guinea: Resolving the effects of excess argon on K-Ar and  $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$  age estimates for magmatism and mineralization. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54:1397-1415.
- Cuff, D.J. and Goudie, A. (2009)** – The oxford companion to global change. *Oxford University Press, Oxford*.
- Nriagu, J. O. (1989)** – A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338:47-49.
- Rauch, J.N. and Pacyna, M. (2009)** – Earth's global Ag, Al, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn cycles. *Global biochemical cycles*, 23.
- Pyle, D.M. and T.A. Mather (2003)** – The importance of volcanic emissions for the global atmospheric mercury cycle. *Atmospheric Environment*, 37:5115.5124.
- Calabrese, S., Aiuppa, A., Allard, P., Bagnato, E., Bellomo, S., Brusca, L., D'Alessandro, W., Parello, F. (2011)** – Atmospheric sources and sinks of volcanogenic



elements in a basaltic volcano (Etna, Italy). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75:7401-7425.

**Yamasoe, M.A., Artaxo, P., Miguel, A.H. and Allen, A.G. (2000)** – Chemical composition of aerosol particles from direct emissions of vegetation fires in the Amazon Basin: water-soluble species and trace elements. *Atmospheric Environment*, 34: 1641:1653.

**Breulmann, G., Markert, B., Weckert, V., Herpin, U., Yoneda, R. and Ogino, K. (2002)** – Heavy metals in emergent trees and pioneers from tropical forest with special reference to forest fires and local pollution sources in Sarawak, Malaysia. *Science of the total environment*, 285:107-115.

**Witt, M.L.I., Mather, T.A., Baker, A.R., De Hoog, J.C.M. and Pyle, D.M. (2010)** – Atmospheric trace metals over the south-west Indian Ocean: Total gaseous mercury, aerosol trace metal concentrations and lead isotope ratios. *Marine Chemistry*, 121:2-16.

**Suvarapu L.N. and Baek, S.O. (2017)** – Determination of heavy metals in the ambient atmosphere: A review. *Toxicology and Industrial Health*, 33:79-96.

**Zhu, G., Hezhong, T. and Hao, J. (2020)** – Global anthropogenic atmospheric emission inventory of twelve typical hazardous trace elements, 1995-2012. *Atmospheric Environment*, 220.

**Han, F.X., Banin, A., Su, Y., Mnts, D.L., Plodinec, M.J., Kingery, W.L. and Triplett, G.E. (2002)** – Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. *Naturwissenschaften*, 89:497-504.

**Klee, R.J. and Graedel, T.E. (2004)** – Elemental cycles : A Status Report on Human or Natural Dominance. *Annual Review of Environmental Ressources*, 29-69-107.

**Lottermoser, B.G. (2010)** – Introduction to Mine Wastes. *Mine Wastes*, Springer Berlin Heidelberg, 1-41.

**Csavina, J., Field, J., Taylor, M.P., Gao, S., Landazuri, A., Betterton, E.A. and Saez, A.E. (2012)** – A review on the importance of metals and metalloids in atmospheric dust and aerosol from mining operations. *Science of the total environment*, 433:68-73.

**Nordstrom, D.K., Alpers, C.N., Ptacek, C.J. and Blowes, D.W. (2000)** – Negative pH and Extremely Acidic Mine Waters from Iron Negative pH and Extremely Acidic Mine Waters from Iron Mountain, California Mountain, California. *US Geological Survey*,

34:254-258.

**Roadcap, G. S., Walton, R. K. and Bethke, C. M. (2005)** – Geochemistry of Extremely Alkaline (pH > 12) Ground Water in Slag-Fill Aquifers. *Ground Water*, 43:806-816.

**Mayes, W. M., Younger, L. and Aumônier, J. (2008)** – Hydrogeochemistry of Alkaline Steel Slag Leachates in the UK. *Water Air Soil Pollution*, 195:35-50.

**Gomes, H. I., Mayes, W. M., Rogerson, M., Stewart, D. I. and Burke I. T. (2016)** – Alkaline residues and the environment: a review of impacts, management practices and opportunities. *Journal of Cleaner Production*, 122:3571-3582.

**Bradl, H.B. (2005)** – Sources and origins of heavy metals. *Interface Science and Technology*, 6:1-27.

**Kirchgeorg, T., Weinberg, I., Hornig, M., Baier, R., Schmid, M.J. and Brockmeyer, B. (2018)** – Emissions from corrosion protection systems of offshore wind farms: Evaluation of the potential impact on the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 136:257-268.

**Van Den Berg, G.A., Meijers, G.G.A., Van Der Heijdt, L.M. and Zwolsman, J.J.G. (2001)** – Dredging-related mobilisation of trace metals: a case study in the Netherlands. *Water Ressources*, 35:1979-1986.

**Cappunys, V., Swennen, R. and Devivier, A. (2006)** – Dredged river sediments: Potential chemical time bombs? A case study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 171:49-66.

**ADEME (2019)** – Rapport d'activité 2018, juillet 2019 - 32 p. - Réf. 010832.

**François, V. (2004)** – Détermination d'indicateurs d'accélération et de stabilisation de déchets ménagers enfouis: Étude de l'impact de la recirculation de lixiviats sur colonnes de déchets. Laboratoire des Sciences et Techniques.

**Bartet, B. (2001)** – Caractérisation des Mâchefers d'incinération d'ordures ménagères : Étude sur les possibilités de transfert de dioxines vers l'environnement. Institut national de l'environnement industriel et des risques.

**De Boom, A., Degrez, M., Carvalho, J. and Correia, M.J.N. (2007)** – Lixiviation acide de résidus d'épuration des fumées d'incinération d'ordures ménagères (REFIOM). *Déchets – Revue Francophone d'écologie industrielle*, 48.

**Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Fudala, J., Strzelecka-Jastrzab, E., Hlawiczka, S., Panasiuk, D., Nitter, S., Pregger, T., Pfeiffer, H. and Friedrich, R (2007)** – Current

and future emissions of selected heavy metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe. *Atmospheric Environment*, 41:8557-8566.

**Pichtel, J. and Anderson, M. (1997)** – Trace metal bioavailability in municipal solid waste and sewage sludge composts. *Bioresource Technology*, 60:223-229.

**Cheng, H., Xu, W., Liu, J., Zhao, Q., He, Y. and Chen, G. (2007)** – Application of composted sewage sludge (CSS) as a soil amendment for turfgrass growth. *Ecological engineering*, 29:96-104.

**Sager, M. (2007)** – Trace and nutrient elements in manure, dung and compost samples in Austria. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:1383-1390.

**Mendes, A.M.S., Duda, G.P., Araujo do Nascimento, C.W. and Silva (2006)** – Bioavailability of cadmium and lead in a soil amended with phosphorus fertilizers. *Scientia Agricola*, 63:328-332.

**Chen, W., Krage, N., Wu, L., Pan, G., Khosrivafard, M. and Chang, A.C. (2008)** – Arsenic, Cadmium, and Lead in California Croplands Soils : Role of Phosphate and Micronutrient Fertilizers. *Journal of Environmental Quality*, 37.

**Anatole-Monnier, L. (2014)** – Effets de la contamination cuprique des sols viticoles sur la sensibilité de la vigne à un cortège de bio-agresseurs. *Thèse de doctorat, Université de Bordeaux*.

**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*, 311:1-3.

**Klee, R.J. and Graedel, T.E. (2004)** – Elemental cycles : A status report on human or natural dominance. *Annual Reviews of Environmental Ressources*, 29:69-107.

**Naidu, R. and Bolan, N.S. (2008)** – Contaminant chemistry in soils : key concepts and bioavailability. *Developments in soil science*, 32:9-37.

**Calvet R. (2003)** – Le sol : propriétés et fonctions. Phénomènes physiques et chimiques, applications agronomiques et environnementales. *France Agricole Editions*.

**Outten, F.W. and Teil, C. (2009)** – Iron-based redox swithces in biology. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11.

**Waldron, K.J. and Robinson, N.J. (2009)** – How bacteria cells ensure that metalloproteins get the correct metal ? *Nature Review Microbiology*, 7:23-25.

- Exley, C. (2003)** – A biogeochemical cycle for aluminium ? *Journal of inorganic biochemistry*, 97:1:7.
- Exley, C. (2016)** – The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie*, 100:51-55.
- Foy, C.D, Chaney, R.L. and Parberry, D.G. (1978)** – Aluminium Toxicity for Plants. *Plant Physiologist*, 29:511-566.
- Kidd, P.S. and Proctor, J. (2000)** – Effects of aluminium on the growth and mineral composition of *Betula pendula* Roth. *Journal of experimental Botany*, 51:1057-1066.
- Seguel, A., Cumming, J.R., Klugh-Stewart, K., Cornejo, P. and Borie, F. (2013)** – The role of arbuscular mycorrhizas in decreasing aluminium phytotoxicity in acidic soils: a review. *Mycorrhiza*, 23:167-183.
- Kopittke, P.M., Menzies, N.W. and Fulton, I.M. (2004)** – Gypsum solubility in seawater, and its application to bauxite residue amelioration. *Australian Journal of Soil Research*, 42:953-960.
- Kopittke, P.M., Menzies, N.W., Wang, P., Pax, F. and Blaney, C. (2016)** – Kinetics and nature of aluminium rhizotoxic effects: a review. *Journal of Experimental Botany*, 67:4451-4467.
- Stass, A., Wang, Y., Eticha, D. and Hors, W. J. (2006)** – Aluminium rhizotoxicity in maize grown in solutions with  $\text{Al}^{3+}$  or  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  as predominant solution Al species. *Journal of Experimental Botany*, 57:4033-4042.
- Brautigan, D.J., Rengasamy, P. and Chittleborough, D.J. (2012)** – Aluminium speciation and phytotoxicity in alkaline soils. *Plant Soil*, 360:187-196.
- Mendel, R.R. (2005)** – Molybdenum: biological activity and metabolism, *Dalton transactions*, 21:3404-3409.
- Pechova, A. and Pavlata, L. (2007)** – Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinarni Medicina*, 52:1-18.
- Koedrith, P., Kim, H., Weon, J. I. and Seo, Y. R. (2013)** – Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216:587-598.
- Frausto da Silva, J. J. R. and Williams, R. J. P. (2001)** – The Biological Chemistry of Elements, The Inorganic Chemistry of Life. *Second Edition*.

**Zoroddu, M.A., Medici, S., Peana, M., Nurchi, V.M., Lachowicz, J.I., Laulicht-Glick, F., Costa, M. (2018)** – Tungsten or Wolfram: Friend or Foe ? *Current Medicinal Chemistry*, 25:65-74.

**Kumpiene, J., Bert, V., Dimitriou, I., Eriksson, J., Friesl-Hanl, W., Galazka, R., Herzig, R., Janssen, J., Kidd, P., Mench, M., Müller, I., Neu, S., Oustriere, N., Puschenreiter, M., Renella, G., Roumier, P.H., Siebielec, G., Vangronsveld, J. and Manier, N. (2014)** – Selecting chemical and ecotoxicological test batteries for risk assessment of trace element-contaminated soils (phyto)managed by gentle remediation options (GRO). *Science of the total environment*, 496:510-522.

**Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.P., Gawronski, S.W., Schröder, P. and Vangronsveld, J. (2010)** – Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of soils and sediments*, 10:1039-1070.

**Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service (2019)** – Inventaire historique des sites activités de service. Disponible sur : [infoterre.brgm.fr/page/anciens-sites-industriels-basias](http://infoterre.brgm.fr/page/anciens-sites-industriels-basias)

**Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y. and Montanarella, L. (2013)** – Contaminated sites in Europe: Review of the current situation based on data collected through a European network. *Journal of Environmental and Public Health*.

**Meuser, H. (2012)** – Soil remediation and rehabilitation: treatment of contaminated and disturbed land (Vol. 23). *Springer Science and Business Media*.

**Yao, Z., Li, J., Xie, H. and Yu, C. (2012)** – Review on Remediation Technologies of Soil Contaminated by Heavy Metals. *Procedia Environmental Sciences*, 16:722-729.

**Mulligan, C.N., Yong, R.N. and Gibbs, B.F. (2001)** – Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 193-207.

**Cundy, A.B., Bardos, R.P., Puschenreiter, M., Mench, M., Bert, V., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Li, X.N., Weyens, N., Witters, N. and Vangronsveld, J. (2016)** – Brownfields to green fields: Realising wider benefits from practical contaminant phytomanagement strategies. *Journal of Environmental Management*, 184:67-77.

**Ibañez, S. G., Oller, A. L. W., Paisio, C. E., Alderete, L. G. S., González, P. S.,**

**Medina, M. I., & Agostini, E. (2018)** – The challenges of remediating metals using phytotechnologies. Heavy metals in the environment: microorganisms and bioremediation. *CRC Press, Taylor & Francis*, 173-191.

**Echevarria, G., Van Der Ent, A., Baker, A., Bani, A., Benizri, E., Laubie, B., Morel, J.L. and Simonnot, M.O. (2015)** – Phytoextraction and phytomining of trace elements from soils. *XXXV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo*, Natal, Brazil.

**Cerdeira-Perez, A., Monterroso, C., Rodriguez-Garrido, B., Machinet, G., Echevarria, G., Prieto-fernandez, A. and Kidd, P.S. (2019)** – Implementing nickel phytomining in a serpentine quarry in NW Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 197:1-13.

**Brooks, R.R. and Robinson, B.H. (1998)** – The potential use of hyperaccumulators and other plants for phytomining. *In Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining*, CAB international.

**Sheoran, V., Sheoran, A.S. and Poonia, P. (2009)** – Phytomining: a review, *Mineral Engineering*, 22:1007:1019.

**Chaney, R.L., Reeves, P.G., Ryan, J.A., Simmons, R.W., Welch, R.M. and Angle, J.S. (2004)** – An improved understanding of soil Cd risk to humans and low cost methods to phytoextract Cd from contaminated soils to prevent soil Cd risks. *Biometals*, 17:549-553.

**Chaney, R.L. and Baklanov, I.A. (2017)** – Phytoremediation and Phytomining: Status and Promise. *Advances in Botanical Research*, 83:189-221.

**Cunningham, S.D. and Berti, R. (2000)** – Phytoextraction and Phytostabilization: Technical, Economic, and Regulatory Considerations of the Soil-Lead Issue. *N. Terry, G. Banuelos (Eds.), Phytoremediation of contaminated soil and water*, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA

**Kidd, P., Mench, M., Alvarez-Lopez, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangrosveld, J. and Puschenreiter, M. (2015)** – Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation*, 17:1005-1037.

- Burges, A., Alkorta, I., Epelde, L. and Garbisu, C. (2018)** – From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. *International Journal of Phytoremediation*, 20:384-397.
- Bouchardon, J.L., Faure, O., Lespagnol, G., Moutte, J., Guy, B., Mimoun, D., Graillot, D., Paran, F., Croze, F., Athénol, J.D., Fernando, B., Boisson, J., Perret, S., Hitmi, A., Verney, P., Moussard Gauthier, C., Ledoigt, G., Goupil, P., Sac, C. and M. Mench (2014)** – “PHYSAFIMM: la PhytoStabilisation, méthodologie Applicable aux Friches Industrielles, Métallurgiques et Minières”, Rapport final. ADEME, 158p..
- M. Mench, J. Vangronsveld, H. Clijsters, N.W. Lepp, R. Edwards (2000)** – *In situ* metal immobilisation and phytostabilisation of contaminated soils. N. Terry, G. Banuelos (Eds.), *Phytoremediation of contaminated soil and water*, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.
- Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A. and Escarré, J. (2006)** – Specific Interactions between Local Metallicolous Plants Improve the Phytostabilization of Mine Soils. *Plant and Soil*, 282:53-65.
- Mendez, M.O. and Maier, R.M. (2008)** – Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments - An Emerging Remediation Technology. *Environmental health perspectives*, 116:278-283.
- Vamerali, T. Bandiera and Mosca, G. (2010)** – Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8:1-17.
- Braun-Blanquet, J. (1964).** Résultats de trois excursions géobotaniques à travers le Portugal septentrional et moyen. *Agronomia Lusitana*.
- Bardgett, R. D., Mommer, L., & De Vries, F. T. (2014)** – Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. *Trends in Ecology & Evolution*, 29:692-699.
- Padilla, F.M. and Pugnaire, F.I. (2006)** – The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(4):196-202.
- Brooker, R.W., Kikvidze, Z. (2008)** – Importance: an overlooked concept in plant interaction research. *Journal of Ecology*, 96(4):703-708.
- Stachowicz, J.J., Graham, M., Bracken, M.E.S. and Szoboszlai, A.I. (2008)** – Diversity enhances cover and stability of seaweed assemblages: the role of heterogeneity and time. *Ecology*, 89(11):3008-3019.



- Prieto, I., Violle, C., Barre, P., Durand, J.L., Ghesquiere, M. and Litrico, I. (2015)** – Complementary effects of species and genetic diversity on productivity and stability of sown grasslands. *Nature Plants*, 1, 15033.
- Ernst, W.H.O. (1998)** – Invasion, dispersal and ecology of the South African neophyte *Senecio inaequidens* in The Netherlands: from wool alien to railway and road alien. *Acta botanica neerlandica. Acta botanica neerlandica*, 47:131-151.
- D’Antonio, C. and Chambers, J. C. (2006)** – Using ecological theory to manage or restore ecosystems affected by invasive plant species. In D. Falk, M. Palmer, and J. Zedler (eds). *Foundations of Restoration Ecology*. Island Press, Covelo, CA.
- Gaertner, M., Breeyen, A.D., Hui, C. and Richardson, D.M. (2009)** – Impacts of alien plant invasions on species richness in Mediterranean-type ecosystems: a meta-analysis. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 33, 3.
- Blum, W. E. H. (2005)** – Soils and Climate Change. *Journal of Soils and Sediments*, 5:67-68.
- Lal, R. (2015)** – Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. *Sustainability*, 7:5875-5895.
- Houben, D., Evrard, L., Sonnet, P. (2013)** – Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar. *Chemosphere*, 92:1450-1457.
- Forján, R., Asension, V., Rodriguez-Vila, A. and Covelo, E.F. (2016)** – Contribution of waste and biochar amendment to the sorption of metals in a copper mine tailing. *CATENA*, 137:120-125.
- Uchimiya, M., Wartelle, L.H., Klasson, K.T., Fortier, C.A. and Lima, I.M. (2011)** – Influence of Pyrolysis Temperature on Biochar Property and Function as a Heavy Metal Sorbent in Soil. *Agricultural and Food Chemistry*, 59:2501-2510.
- Ros, M., Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, M.T. and Insam, H. (2006)** – Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:3443-3452.
- Saison, C., Degrange, V., Olivier, R., Millard, P., Commeaux, C., Montange, D., Le Roux, X. (2006)** – Alteration and resilience of the soil microbial community following



compost amendment: effects of compost level and compost borne microbial community. *Environmental Microbiology*, 8, 2.

**Epstein, E. (1966)** – Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature*, 212, 1324-1327.

**Epstein, E. and Bloom, A.J. (2005)** – Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. *2<sup>nd</sup> Edition, Sinauer Associated, Sunderland*.

**Brown, P.H., Welch, R.M. and Cary, E.E. (1987)** – Nickel: A Micronutrient Essential for Higher Plants. *Plant Physiology*, 85:801-803.

**Sorensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. and Wuertz, S. (2005)** – Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Review Microbiology*, 3:700-710.

**Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T. Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G (2003)** – Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 4.

**Sprocati, A.R, Alisi, C., Tasso, F., Fiore, A., Marconi, P., Langella, F., Hafeburg, G., Nicoara, A., Neagoe, A. and Kothe, E. (2014)** – Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 6824-6835.

**Berthelot, C. Leyval, C., Foulon, J., Chalot, M. and Blaudez, D. (2016)** – Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 10.

**Kidd, P.S., Alvarez-Lopez, V., Becerra-Castro, C., Cabello-Conejo, M. and Prieto-Fernandez, A. (2017)** – Potential Role of Plant-Associated Bacteria in Plant Metal Uptake and Implications in Phytotechnologies. *Advances in Botanical Research*, 83:87-126.

**Pirozynski, K.A. and Malloch, D.W. (1975)** – The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems*, 6:153-164.

**Steidinger, B.S., Crowther, T.W., Liang, J., Van Nuland, M.E., Werner, G.D.A., Reich, P.B., Nabuurs, G.J., de-Miguel, S., Zhou, M., Picard, N., Herault, B., Zhao, X., Zhang, C., Routh, D., Peay, K.G. and GFBI consortium (2019)** – Climatic controls

of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature*, 569:404-408.

**Rillig, M.C. (2004)** – Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, 84:355-363.

**Mathur, N., Singh, J., Bohra, S. and Vyas, A. (2007)** – Arbuscular Mycorrhizal Status of Medicinal Halophytes in Saline Areas of Indian Thar Desert. *International Journal of Soil Science*, 2:119-127.

**Meier, S., Borie, F., Curaqueo, G., Bolan, N. and Cornejo, P. (2012)** – Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. *Applied Soil Ecology*, 61:280-287.

**Marschner, H., & Dell, B. (1994)** – Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and soil*, 159: 89-102.

**Clark, R. Á., & Zeto, S. K. (2000)** – Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of plant Nutrition*, 23:867-902.

**Leung, H.M., Wang, Z.W., Ye, Z.H., Yung, K.L., Peng, X.L. and Cheung, K.C. (2013)** – Interactions Between Arbuscular Mycorrhizae and Plants in Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils: A Review. *Pedosphere*, 23:549-563.

**Ma, X., Luo, W., Li, J. and Wu, F. (2019)** – Arbuscular mycorrhizal fungi increase both concentrations and bioavailability of Zn in wheat (*Triticum aestivum* L) grain on Zn-spiked soils. *Applied Soil Ecology*, 135:91-97.

**Schneider, J., Bundschuh, J. and Araujo do Nascimento, C.W. (2016)** – Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site. *Science of total Environment*, 572:86-97.

**Orłowska, E., Orłowski, D. and Mesjasz-Przybyłowicz, J. (2010)** – Role of Mycorrhizal Colonization in Plant Establishment on an Alkaline Gold Mine Tailing. *International Journal of Phytoremediation*, 13:185-205.

**Firmin, S., Labidi, L., Fontaine, J., Laruelle, F., Tisserant, B., Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Dalpe, Y., Grandmoulin, A., Douay, F., Shirali, P., Verdin, A. and Lounes-Hadj Sahraoui, A. (2015)** – Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation protects *Miscanthus × giganteus* against trace element toxicity in a highly metal-contaminated site. *Science of the Total Environment*, 527: 91-99.

- Zhang, X.H., Lin, A.J., Gao, Y.L., Reid, R.J., Wong, M.H. and Zhu, Y.G. (2009)** – Arbuscular mycorrhizal colonisation increases copper binding capacity of root cell walls of *Oryza sativa* L. and reduces copper uptake. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:930-935.
- Wu, S., Zhang, X., Chen, B., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., Sun, Y. and Wang, Y. (2016)** – Transformation and Immobilization of Chromium by Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Revealed by SEM–EDS, TEM–EDS, and XAFS. *Environmental Science & Technology*, 49:14036-14047.
- Hider, R.C. and Kong, X. (2010)** – Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27:637-657.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. (2013)** – Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2:1-14.
- Macy, J.M., Santini, J.M., Pauling, B.V., O’Neil, A.H. and Sly, L.I. (2000)** – Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria : mechanisms of arsenate reduction. *Archives Microbiology*, 173:49-57.
- Valls, M. et de Lorenzo, V. (2002)** – Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:327-338.
- Gadd, G.M. (2004)** – Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122:109-119.
- Zahoor, A. and Rehman, A. (2009)** – Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environment Sciences*, 21:814-820.
- Garavaglia, L., Cerdeira, S.B. and Vullo, D.L. (2010)** – Chromium (VI) biotransformation by  $\beta$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria from natural polluted environments: A combined biological and chemical treatment for industrial wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 175:104-110.
- Sessitch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangrosveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K. and Puschenreiter, M. (2013)** – The role of plant-associated bacteria in the mobilization

and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 60:182-194.

**Cycoń, M., Mroziak, A. and Piotrowska-Seget, Z. (2017)** – Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*, 172:52-71.

**Ghasemi, Z., Ghaderian, S.M., Monterroso, C. and Kidd, P.S. (2018)** – Improving the growth of Ni-hyperaccumulating plants in serpentine quarry tailings. *International Journal of Phytoremediation*, 20, 7.

**Kudoyarova, G.R., Arkhipova, T.N. and Melent'ev, A.I. (2015)** – Role of Bacterial Phytohormones in Plant Growth Regulation and Their Development. *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*, 69-86.

**Benizri, E. and Kidd, P. (2018)** – The Role of the Rhizosphere and Microbes Associated with Hyperaccumulator Plants in Metal Accumulation. In *Agromining: Farming for metals* (pp. 157-188). Springer, Cham.

**Visioli, G., Vamerali, T., Mattarozzi, M., Dramis, L., & Sanangelantoni, A. M. (2015)** – Combined endophytic inoculants enhance nickel phytoextraction from serpentine soil in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Frontiers in plant science*, 6:638.

**Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Motasharezadeh, B., & Sarmadian, F. (2020)** – Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere*, 14:100196.

**Moreira, H., Pereira, S. I., Marques, A. P., Rangel, A. O., & Castro, P. M. (2016)** – Mine land valorization through energy maize production enhanced by the application of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Environmental Science and Pollution Research*, 23:6940-6950.

**Pereira, S.I.A, Barbosa, L., Castro, P.M.L. (2015)** – Rhizobacteria isolated from a metal-polluted area enhance plant growth in zinc and cadmium contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12:2127-2142.

**Alvarez-Lopez, V., Prieto-Fernandez, A., Janssen, J., Herzig, R., Vangronsveld, J., Kidd, P.S. (2016b)** – Inoculation methods using *Rhodococcus erythropolis* strain P30

affects bacterial assisted phytoextraction capacity of *Nicotiana tabacum*. *International Journal of Phytoremediation*, 18:406-415.

**Thijs S, Sillen W, Rineau F, Weyens N, Vangronsveld J. (2016)** – Towards an enhanced understanding of plant–microbiome interactions to improve phytoremediation: engineering the metaorganism. *Frontiers in Microbiology*, 7:341.

**Pilon-Smits, E. (2005)** – Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56:15-39.

**Da Silva, W.R., Vieira da Silva, F.B., Araujo, P.R.M. and Do Nascimento, C.W.A. (2017)** – Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144:522-530.

**Agnello, A.C., Potysz, A., Fourdin, C., Huguenot, D. and Chauhan, P.S. (2018)** – Impact of pyrometallurgical slags on sunflower growth, metal accumulation and rhizosphere microbial communities. *Chemosphere*, 208:626-639.

**Luo, Y., Wu, X., Sun, H. and Wu, Y. (2020)** – Root-induced changes in aggregation characteristics and potentially toxic elements (PTEs) speciation in a revegetated artificial zinc smelting waste slag site. *Chemosphere*, 125414.

**Remon, E. (2006)** – Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. *Thèse de doctorat. Université Jean-Monnet Saint-Etienne*.

## **Chapitre 2. Aciers et laitiers**

### **2.1. La production d'acier**

#### *a) Brève histoire de la fabrication de l'acier*

**Histoire ancienne : apparition de la métallurgie du fer**

**Révolution industrielle et ingénierie du fer**

**Arrivée des aciers spéciaux et des procédés modernes**

#### *b) Filières actuelles et production mondiale*

**Filières d'élaboration des aciers**

**Chiffres de la production d'acier**

### **2.2. Les coproduits de l'acier : les laitiers**

#### *a) Des déchets spécifiques aux procédés*

**Origine et définition des laitiers**

**Filières de production des laitiers**

#### *b) Laitiers disponibles*

**Stocks de laitiers**

**Présentation du site d'étude (IFAM) et de son terroir**

## Chapitre 2: Aciers et laitiers

L'acier constitue un matériau omniprésent dans nos sociétés modernes. La définition de l'« acier » a beaucoup évolué dans le temps en fonction des critères d'utilisation et des modes de fabrication (Le Coze, 2017). Actuellement, le terme acier définit les alliages composés essentiellement de fer et de 0,02 % à 2,00 % de carbone. Dans le cas des aciers spéciaux tels que les inoxydables, cette composition est complétée par des métaux à l'état de traces, conférant au matériau des caractéristiques particulières. Le pourcentage de carbone qu'il contient influence fortement ses propriétés principales. En dessous de 0,02%, l'alliage obtenu est très malléable et est appelé « acier doux ». Au-delà de 2,00%, il est plus dur mais plus cassant, on parle alors de « fonte ». Ces alliages présentent de nombreuses propriétés intéressantes gravitant autour de la robustesse. Exploré à l'origine par les forgerons dans l'Antiquité et basé sur la fabrication d'outils et d'armes, il est devenu beaucoup plus généraliste jusqu'à nos jours. Indispensable à de nombreuses applications industrielles, l'acier est aujourd'hui incontournable dans de nombreux domaines à travers le monde. Cependant, la fabrication de l'acier s'accompagne inévitablement d'une production de scories et de laitiers, des coproduits de l'acier. En raison de leur composition atypique et de leur abondance dans le monde, les laitiers constituent des matériaux pouvant impacter l'environnement et nécessitent la recherche de solutions de valorisation et de gestion.

### 2.1. La production d'acier

#### *a) Brève histoire de la fabrication de l'acier*

##### **Histoire ancienne : apparition de la métallurgie du fer**

La fusion du fer consiste à extraire le métal utilisable dans les minerais de fer oxydés en y faisant pénétrer du carbone, c'est la cémentation. Ce principe restera très longtemps l'unique voie de production en métallurgie du fer. La réduction directe constitue la base de ce procédé : la chaleur dégagée par la combustion du carbone ( $C + O_2 \rightarrow CO_2$  /  $CO_2 + C \rightarrow 2CO$ ) fait fondre le fer et ses résidus en une masse liquide appelée loupe. Le fer

chaud est ensuite réduit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3 + \text{CO} \rightarrow 2\text{FeO} + \text{CO}_2$  /  $\text{FeO} + \text{CO} \rightarrow \text{Fe (liq)} + \text{CO}_2$ ) en se saturant de carbone par contact avec le combustible. La réduction du minerai de fer peut aussi être facilitée par soufflage d'air : celui-ci devient un gaz réducteur qui transforme plus efficacement les oxydes de fer du minerai en métal. Une étape de martelage permettait ensuite d'éliminer les impuretés (oxydes, silicates ou sulfures) incluses dans le matériau pour donner du fer forgé d'une pureté relative.

L'élaboration de l'acier existe depuis des millénaires et semble être apparue comme un coproduit de la fusion du cuivre à l'âge du bronze. Des vestiges archéologiques ont permis de prouver l'utilisation de fours pour la fusion de minerais de fer en Afrique subsaharienne et en Chine dès la fin du II<sup>ème</sup> millénaire avant J.-C. (Myler et Van Der Merwe, 1994 ; Tylecote, 2013). L'emploi de techniques empiriques ne permettait pas d'obtenir les matériaux contrôlés que sont nos aciers actuels. De plus, les minerais de fer ne proviennent pas nécessairement des mêmes gisements et diffèrent donc en termes de minéralogie, augmentant l'hétérogénéité des premiers aciers. Cependant des clous gaulois ou des fers de Tataara, bien qu'hétérogènes, ont révélé des teneurs en carbone comparables aux aciers actuels. Malgré cela, les connaissances en métallurgie semblent apparaître sporadiquement dans le monde. Par exemple, la fonte était déjà utilisée par les Chinois dès le V<sup>ème</sup> siècle av. J.-C. pour mouler diverses pièces (cloches, pagodes, chaudrons, *etc.*) alors que les Européens n'élaborent leurs premiers canons en fonte qu'à partir du XVI<sup>ème</sup> siècle (Le Coze, 2012). A l'échelle européenne, l'âge du fer se divise en deux périodes principales : de -800 à -480 av. J.-C. : « Premier âge du fer » ou culture de Hallstatt et de -480 à -50 av. J.-C. : « Deuxième âge du fer » ou culture de La Tène. Les bas fourneaux du début de l'âge du fer jusqu'au Moyen-Âge atteignaient des températures entre 1 000 à 1 200 °C. En Europe, le XV<sup>ème</sup> siècle marque le début de la généralisation du haut fourneau (Blast Furnace : BF). Les foyers plus grands permettent d'atteindre des températures plus hautes, entraînant une meilleure diffusion du carbone dans le métal. L'influence combinée d'un foyer chaud plus grand et d'un matériau plus fusible permet au métal de sortir à l'état liquide du four.



Les premiers aciers tels que nous les définissons aujourd'hui ont été décrits vers le X<sup>ème</sup> siècle après J.-C. et venaient du Proche-Orient. Sous la fameuse appellation des « aciers de Damas », ils étaient forgés à partir de lingots de Wootz, importés d'Inde et du Sri Lanka. L'acier Wootz contenait plusieurs éléments additifs (Cr, Mo, Nb, Mn, V) intervenant sur les caractéristiques finales des lames de Damas. Encore inconnu en Europe jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, cet acier était déjà élaboré en creuset. Verhoeven et Pendray (1998) ont émis l'hypothèse que les secrets de fabrication du Wootz auraient disparu, en raison de l'épuisement des gisements de fer qui contenaient naturellement les additifs que nous employons aujourd'hui.

### **Révolution industrielle et ingénierie du fer**

A la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, la méthode du puddlage développée par Peter Onions puis améliorée par Henry Cort marque une forte avancée de la métallurgie (Le Coze, 2012). L'invention du puddlage marque l'apparition de la filière indirecte, s'opposant à la traditionnelle réduction directe : la réduction et la fusion s'effectuent en BF, puis la fonte obtenue est convertie par puddlage. En 1856, Henry Bessemer invente un nouveau procédé visant à contrôler l'opération de décarburation. Le travail de la fonte décarburée à l'état liquide facilite l'élimination des impuretés et donc la production d'acier doux. En 1863, le procédé Siemens-Martin s'ajoute à celui de Bessemer en récupérant les gaz de combustion issus du soufflage d'air. En augmentant encore les températures atteintes, cette innovation permet de combiner ferrailles d'acier et fonte pour les refondre dans un four à foyer ouvert. L'apogée du procédé Bessemer-Thomas se localise aux alentours de 1870 tandis que celle du procédé Siemens-Martin se situe vers 1950 (Figure 4).

Au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, l'analyse chimique se développe et de nombreux adjuvants sont testés dans des essais visant à reproduire les propriétés du Wootz (*cf.* 1.1.a) § 1.). L'objectif est alors de produire industriellement la meilleure qualité d'acier connue. Ainsi, de 1819 à 1844, Faraday et Stotart (1819), Berthier (1821), Boussingault (1821) et De Luynes (1844) ont expérimenté l'addition de métaux tels que Ni, Cu, Au, Ag, Pt, Rh, Sn, Sn, Ti, Ir, Os, Pd, Cr, Si, W, Mn dans les aciers fondus. Même si une vaste liste d'alliages

de fer potentiels a été décrite par Berzelius en 1939, les premiers élaborés industriellement ne l'ont été que vingt années plus tard : les métaux additifs étaient encore rares, tout comme les débouchés commerciaux (Lesley, 1859).

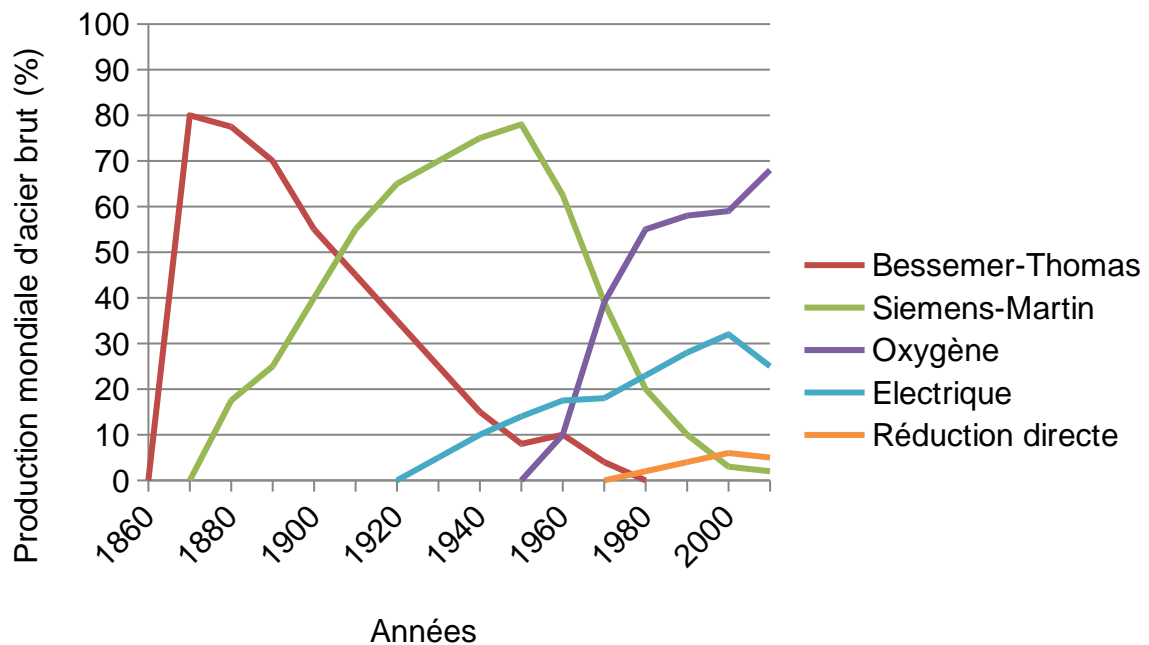
### **Arrivée des aciers spéciaux et des procédés modernes**

Au début du XX<sup>ème</sup>, les progrès de l'électrotechnique rendent les performances du four électrique telles qu'il supplantera progressivement le four Siemens-Martin au cours du siècle. Le four à arc électrique (Electric Arc Furnace : EAF) utilise l'énergie thermique établie entre les électrodes de graphite et la charge métallique. L'EAF fait ainsi fondre des ferrailles d'acier ou des minerais préréduits en BF. En Europe, l'adoption de l'EAF est facilitée par la forte disponibilité en ferrailles dans le contexte des guerres mondiales. Ces fours constituent d'exceptionnels dispositifs de recyclage des ferrailles : actuellement, 30 à 40 % de la production mondiale d'acier est issue de ce recyclage. De plus, les hautes températures qu'il peut atteindre sont capables de dissoudre tous les éléments, y compris ceux présentant les plus hauts points de fusion. C'est ainsi que l'EAF permet, depuis les années 60 de produire des aciers inoxydables fortement alliés (18% Cr, 10% Ni, 3% Mo, *etc.*). Les premiers EAF du début du XX<sup>ème</sup> siècle avaient une capacité de 2 à 3 tonnes. Les EAF actuels peuvent contenir jusqu'à 150 tonnes et atteindre des températures de 1800°C. Finalement, l'EAF est très adaptable et peut aussi bien servir à la production d'aciers ordinaires, d'aciers alliés destinés à la construction mécanique ou d'aciers fortement alliés, tels que les aciers inoxydables.

Vers 1950 et parallèlement à l'émergence des EAF, Robert Durrer invente le procédé BOS (Basic Oxygen Steelmaking) en remplaçant l'air soufflé dans les convertisseurs Bessemer-Thomas par de l'oxygène pur. Ce procédé domine le marché actuel et les convertisseurs à oxygène (Basic Oxygen Furnace : BOF) fournissent 74% de l'acier brut produit dans le monde. Le procédé est dit basique car de la chaux ou de la dolomie sont ajoutées au flux d'oxygène afin de favoriser l'élimination des impuretés et de protéger le revêtement du convertisseur. Le fonctionnement de la plupart des convertisseurs récents implique en plus l'injection de gaz inerte, c'est le procédé connu sous l'appellation AOD

(Argon Oxygen Decarburization). L'argon est utilisé pour diluer le flux d'oxygène. Cela minimise l'oxydation indésirable des éléments précieux, rendant le procédé AOD particulièrement rentable pour élaborer des aciers spéciaux. Les BOF modernes peuvent convertir la fonte en acier en moins de 40 minutes contre les 10 heures nécessaires en fours à foyer ouvert. Elle réduit également de 1 000 le besoin en main-d'œuvre dans les aciéries, ce qui explique comment elle est devenue le premier mode de production d'acier brut à l'échelle mondiale (Figure 4).

A la fin des années 70, la désoxydation, la désulfuration, le calibrage de l'acier, le contrôle inclusif et l'ajustement de la température de coulée sont autant d'opérations de raffinage transférées au four à poche (Ladle Furnace : LF). La fonderie primaire est maintenant débarrassée de ces étapes de production, améliorant d'autant plus les rendements des EAF et des BOF.



**Figure 4 :** Production mondiale d'acier brut en fonction des divers procédés d'élaboration depuis 1860  
([www.worldsteel.org](http://www.worldsteel.org))

#### *b) Filières actuelles et production mondiale*

## **Filières d'élaboration des aciers**

La précédente chronologie de la fabrication de l'acier montre à quel point les processus ont été optimisés jusqu'à aujourd'hui. La qualité de l'acier et les performances des aciéries ont évolué en fonction des exigences et des technologies disponibles, elles-mêmes souvent dues à des pénuries. Mais les ressources naturelles, les technologies, les politiques et donc les usages ne sont pas les mêmes dans chaque pays, conduisant à des hétérogénéités mondiales. Actuellement, les aciers sont principalement produits de deux manières : en haut fourneau suivi d'une conversion de la fonte au four à oxygène (BF-BOF), filière dénommée « minerais de fer vers acier » et en four à arc électrique (EAF) ou filière « ferraille vers acier ». Ces deux chaînes représentaient respectivement 74,0 % et 25,5 % de la production mondiale d'acier en 2016 (« World Steel Association », Steel Statistical Yearbook 2018). Des combinaisons de voies de production peuvent également exister, selon la configuration des aciéries et les matières premières utilisées. La voie BF-BOF consomme essentiellement du minerais de fer et des ferrailles, en ajoutant du coke comme source de carbone et d'énergie, mais aussi de l'oxygène pour la conversion de la fonte brute. L'EAF est plus spécifiquement destiné au recyclage des déchets d'acier par l'électricité et pour l'élaboration des aciers spéciaux. D'autres sources de fer peuvent également être utilisées dans la filière EAF, tels que les minerais de fer prétraités par réduction directe notamment.

## **Chiffres de la production d'acier**

La figure 5a. présente la production mondiale d'acier brut de 1950 à 2018. La demande en acier est aujourd'hui 7 fois plus importante que celle des années 50. Des estimations récentes suggèrent que la production mondiale aura tendance à augmenter de 1,5 fois jusqu'au milieu du 21<sup>ème</sup> siècle (Pandia *et al.*, 2016). Depuis 2000, la seule période au cours de laquelle la production mondiale d'acier a diminué consécutivement d'une année à l'autre est de 2007 (1348 Mt) à 2009 (1238 Mt), symptôme de la crise économique. Les trois premières sociétés sidérurgiques sont ArcelorMittal (96,42 Mt), China Baowu

Group (67,43 Mt) et Nippon Steel Corporation (49,22 Mt). Inégalement réparties dans le monde, ces trois entreprises produisent plus de 10 % de l'acier mondial. L'Asie est le continent où la demande et la production d'acier brut sont les plus importantes, ce qui explique la domination actuelle de la sidérurgie chinoise. La production actuelle d'acier brut chinois est supérieure à celle mondiale de 2000 : équivalant alors 15,1 % de la fabrication mondiale, elle était de 51,2 % en 2018 (Figure 5b.).

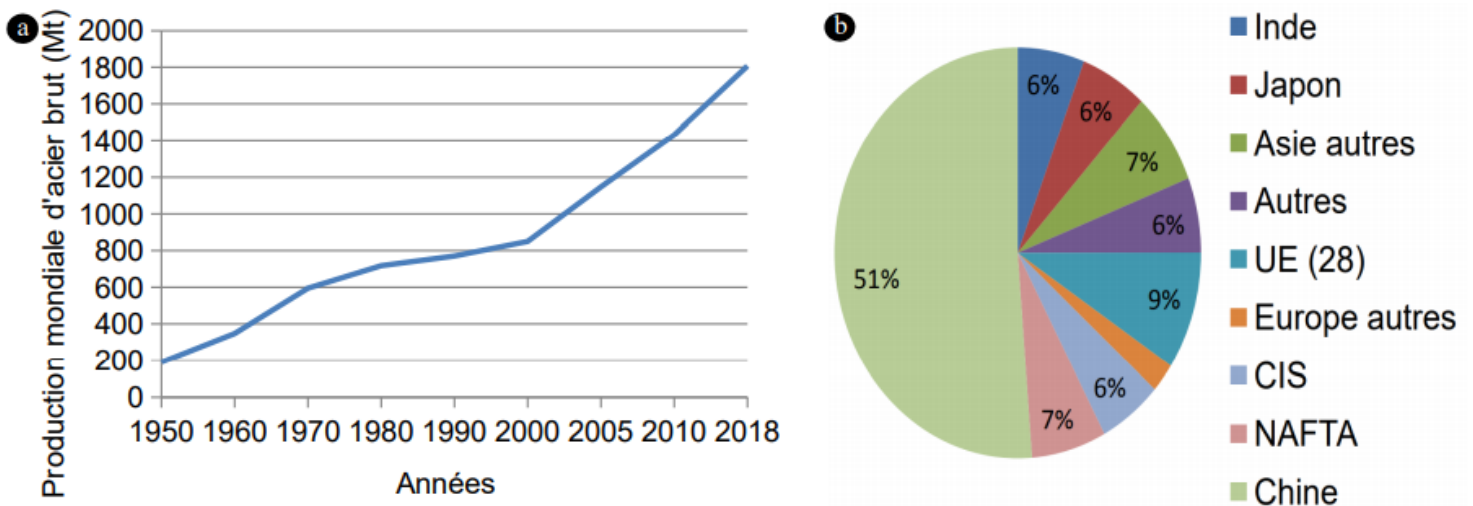


Figure 5 : Production mondiale d'acier brut de 1950 à 2018 (a)

Production mondiale d'acier brut en 2018 (% des 1808 Mt produites) (b)

Autres : Amérique centrale et du Sud (2,5%), Moyen-Orient (2,1%), Afrique (1,0%), Australie et Nouvelle-Zélande (0,4%)

CIS: Commonwealth of Independent States

NAFTA: North American Free Trade Agreement

([www.worldsteel.org](http://www.worldsteel.org))

## 2.2. Les coproduits de l'acier : les laitiers

### **Origine et définition des laitiers**

Parmi les résidus de production de l'acier, il faut distinguer les scories des laitiers. Les scories désignent les impuretés solides non réactives des traitements anciens. Aux prémices de la métallurgie du fer, l'objectif était de réduire le minerai de fer tout en le séparant de sa gangue à des températures d'environ 1 200°C (*cf.* 1.1.a) § 1.). Mais le SiO<sub>2</sub> est naturellement présent dans cette gangue et son point de fusion est élevé. Le minerai devenant difficile à réduire, les scories résultantes étaient riches en Fe<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>, impliquant ainsi une grande perte de minerai de fer. Des scories de l'époque gallo-romaine ont même été exploitées au cours du XX<sup>ème</sup> siècle comme gisement de minerai relativement riche (environ 55% de Fe). Les oxydes basiques du minerai (principalement CaO) neutralisent le SiO<sub>2</sub>, réduisant la perte de fer mais toujours en augmentant le point de fusion. Or, celui du fer se situe à 1 535 °C et était par conséquent impossible à atteindre par des moyens rudimentaires. Les minerais de fer devaient alors présenter de faibles teneurs en CaO et en SiO<sub>2</sub> pour être correctement exploités et limiter la perte de Fe dans les scories (Le Coze, 2017).

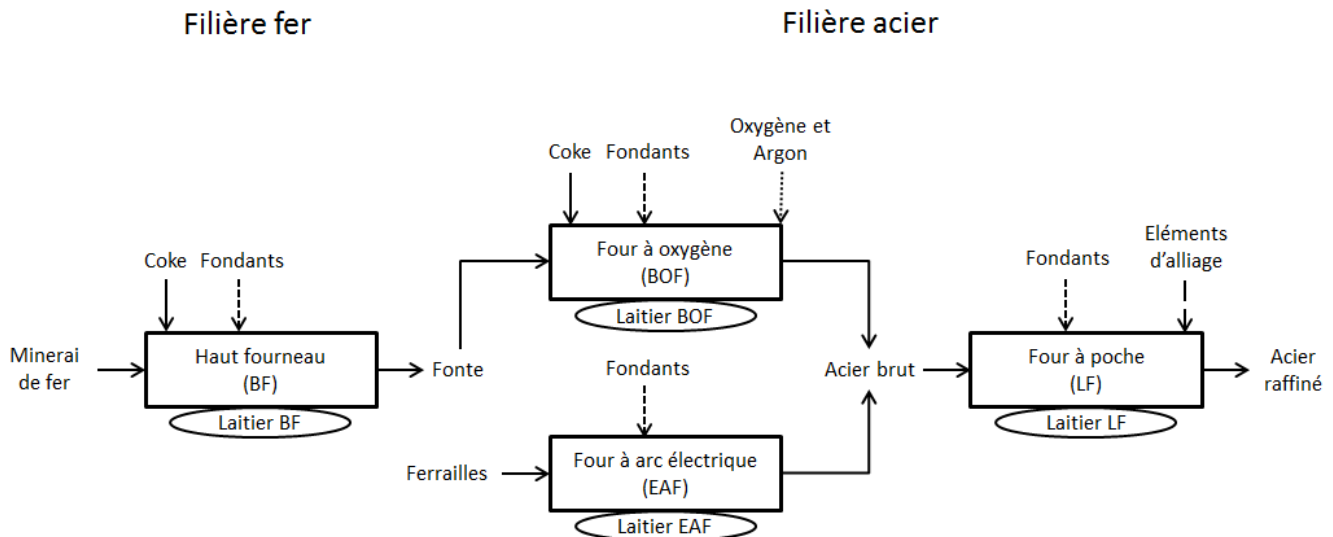
Les laitiers sont des solutions ioniques d'oxydes de métaux en fusion et de composés silicatés qui flottent sur l'acier. Leur rôle est de réagir à l'état liquide pour piéger les résidus de la gangue du minerai, les résidus de charbon (en BF) et autres impuretés telles que P ou S. L'appellation de laitier vient de l'aspect de la couche liquide qu'il forme et flotte sur la fonte ou sur l'acier fondu. Les interactions laitier-métal étaient déjà connues depuis l'existence de la méthode de puddlage (*cf.* 1.1.a) § 2.). Ce n'est pourtant qu'avec le développement de l'analyse chimique que le rôle clé de purification par les laitiers a été étudié. En métallurgie, les composés ajoutés qui réagissent avec l'acier en fusion et deviendront les laitiers sont appelés fondants. Ce sont des agents chimiques de nettoyage, fluidisant ou purifiants. Les laitiers modernes peuvent être classés en quatre groupes, comme le montre la figure 6. Il y a cependant autant de laitiers qu'il existe de compositions de gangues de minerais, ou de procédés de fabrication d'aciers. Les

exigences toujours plus strictes de qualité de l'acier ont conduit à la maîtrise des procédés, rendant la composition des laitiers actuels bien précise. L'indice de basicité, couramment utilisé pour prédire l'efficacité des laitiers, est défini comme le rapport entre les oxydes basiques ( $\text{CaO}$ ,  $\text{MnO}$ ,  $\text{FeO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ , *etc.*) et acides ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , *etc.*). En dehors de renseigner sur sa basicité, cet indice permet d'évaluer son agressivité pour le revêtement réfractaire du four, sa fluidité, sa densité ou encore son degré d'oxydation, permettant de déphosphorer ou désulfurer efficacement. Par ailleurs, la maîtrise de la composition des laitiers permet la valorisation de leurs propriétés intrinsèques.

### **Filières de production des laitiers**

Les quantités relatives de laitiers produits dépendent des procédés employés. Actuellement et pour produire 1 t d'acier élaboré, le BF produit entre 250 et 300 kg de laitier, le BOF en produit 100 kg, l'EAF environ 70 kg et l'affinage en poche environ 10 kg. On retrouve chez chacun de ces laitiers des caractéristiques propres pouvant être valorisées. Le laitier sortant de BF est sous forme liquide à  $1500^\circ\text{C}$ , son temps de refroidissement conditionne l'obtention de 2 différents laitiers. Refroidi lentement à l'air libre, du laitier de BF cristallisé est obtenu. De couleur gris et généralement poreux, leur concassage permet la production de granulats de haute résistance mécanique couplée à une faible conductivité thermique. Alternativement, du laitier de BF granulé s'obtient à la suite d'un refroidissement rapide par trempage à l'eau sous pression. Les laitiers qu'il en résulte sont de couleur jaune/beige et constituent de bons liants hydrauliques. Les laitiers de BOF se caractérisent par une teneur élevée en chaux et sont refroidis à l'air, à l'eau puis concassés. La production d'aciers carbone en filière électrique génère du laitier de four et du laitier de poche. Les granulats résultant du concassage qui s'en suit disposent d'importantes caractéristiques géotechniques (dureté, anti-glissement, anti-polissage). Bien que les aciers spéciaux produisent en plus du laitier d'AOD, leur traitement est identique. Le tableau III montre l'évolution de la production d'acier brut et des laitiers en France au cours des dix dernières années. Au cours de cette décennie et toutes filières confondues, la production d'1 t d'acier brut conduit en moyenne à l'obtention de plus de 300 kg de laitier. Après avoir culminé à environ 14 Mt en 1974, la production française

de laitiers a progressivement diminué. En raison de la diminution de la production d'acier et de l'optimisation des procédés, il n'est plus que de 4,6 Mt, tous secteurs confondus.



**Figure 6:** Schéma simplifié des procédés d'élaboration du fer, des aciers et de production des différents laitiers associés

**Tableau III :** Evolution de la production d'acier brut et de laitiers (en Mt) en France entre 2008 et 2017 ([www.worldsteel.org](http://www.worldsteel.org))

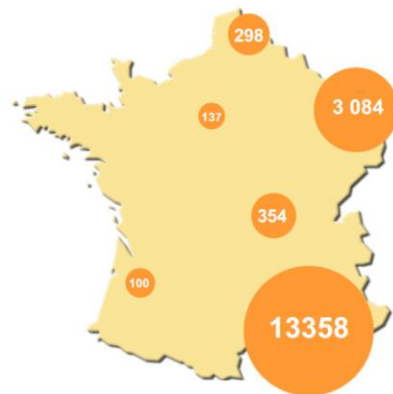
Année	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Production d'acier brut	17.9	12.8	15.4	15.8	15.6	15.7	16.1	15.0	14.4	15.5
Production de laitiers	5.8	3.8	4.9	4.8	4.9	5.1	5.3	4.9	4.7	4.6
BF – laitiers granulés	2.8	1.8	2.4	2.3	1.9	2.1	2.7	2.2	2.3	2.6
BF – laitiers cristallisés	0.8	0.6	0.6	0.5	1.0	1.0	0.7	0.8	0.7	0.5
BF – laitiers ferreux	3.6	2.3	3.0	2.8	2.9	3.0	3.4	3.0	3.0	3.0
BOF – laitiers	1.2	0.8	1.1	1.1	1.1	1.3	1.2	1.3	1.0	1.0
EAF (aciers carbone) – laitiers	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4
EAF (aciers spéciaux) – laitiers	0.4	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
BOF/EAF – laitiers d'acier	2.2	1.5	1.8	2.0	2.0	2.0	1.9	1.9	1.7	1.6

*b) Laitiers disponibles*



## Stocks de laitiers

Environ 45 Mt de laitiers sont produites chaque année en Europe. Les laitiers de fraîche production entrent dans une filière de valorisation dès leur élaboration. Par opposition, les laitiers de stock sont issus de productions non valorisées constituées au fil des décennies. Il existe aujourd'hui 21 sites sidérurgiques en France. L'estimation des stocks recensés sur le territoire se porte à près de 40 Mt. Les laitiers de BF cristallisés issus du XIX<sup>ème</sup> et XX<sup>ème</sup> siècles sont fortement représentés dans cette estimation, à hauteur d'environ 25 Mt. La production de ces types de laitiers se concentre essentiellement dans les régions du Nord (Dunkerque), de la Provence (Fos-sur-Mer) et en Lorraine (Pont-à-Mousson). Les stocks de laitiers d'aciers s'élèvent à 17,3 Mt et comprennent les laitiers de BOF et d'EAF (Figure 7) [« Centre Technique et de Promotion des Laitiers sidérurgiques » (Statistiques 2018)]. Les aciéries électriques en France restent des unités industrielles de taille modeste dont les installations sont encore récentes (moins de 30 ans). Ainsi, il n'existe que très peu de stocks de laitiers issus de la filière électrique (environ 1 Mt). Plusieurs initiatives sont actuellement en cours sur divers sites sidérurgiques afin d'exploiter ces stocks historiques. Entre 0,7 et 1 Mt de laitiers issus des terrils situés sur le site de Fos-sur-Mer et sur les sites lorrains sont exploités, valorisés et mis sur le marché chaque année.



**Figure 7** : Répartition géographique des stocks français de laitiers d'aciérie en 2018 (en kT)

**Présentation du site d'étude (IFAM) et de son terril**

Le site de production de Châteauneuf (Loire, France), Industeel-France ArcelorMittal, est le premier fournisseur européen de tôles d'acier fortement alliées d'épaisseur comprise entre 3 mm et 1050 mm. Sa décharge métallurgique (45°26' N, 4°17' E) a reçu les coproduits de l'aciérie depuis environ 1850 jusqu'en 2001. L'article L541-1 du code de l'environnement visant à prévenir la production et la nocivité des déchets, à limiter leur transport ainsi qu'à favoriser leur valorisation, empêche désormais l'usine de continuer à utiliser cette friche comme décharge pour ses laitiers. Le terril en question contient approximativement 500 000 m<sup>3</sup> de scories et de laitiers, réparties sur une superficie d'environ 5 ha (Figure 8). La couche superficielle du terril est essentiellement constituée de laitiers d'aciérie de filière EAF. Ce matériau, sur lequel porte l'ensemble de cette étude sera noté « laitier d'IFAM » (Industeel-France ArcelorMittal).



**Figure 8** : Vue aérienne de la décharge sidérurgique d'Industeel-France ArcelorMittal  
(échelle approximative : 2 cm = 50 m)

## References

- Le Coze, J. (2017)** – Récits sidérurgiques d’hier et d’aujourd’hui, Fers, fontes, aciers : 4000 ans d’affinage et de purification. *EDP Sciences*
- Myler, D.E. and Van Der Merwe, N.J. (1994)** – Early Metal Working in Sub-Saharan Africa: A Review of Recent Research. *Journal of African History*, 35:1-36.
- Tylecote, R.F. (2013)** – A History Of Metallurgy. *Maney Publishing, Third edition*.
- Le Coze, J. (2012)** – L’acier fondu au creuset en France au 19e siècle : héritage de l’Orient et naissance des aciers spéciaux – I : Description des outils et des procédés de fusion en creuset depuis le 9e jusqu’au 20e siècle. *Matériaux et Techniques*, 100:343-366.
- Verhoeven, J. and Pendray, A. (1998)** – The mystery of Damascus Sword. *Muse*, 2:35-43.
- Lesley, J.P. (1859)** – The iron manufacturer’s guide to the furnaces, forges and rolling mills of the United States. *Edition J. Wiley, New York*.
- World Steel Association (2018)** – Steel Statistical Yearbook. [www.worldsteel.org](http://www.worldsteel.org)
- Pandia, O. Saracin, I., Dobrota, D., Danea-Christu, I. and Marin, G. (2016)** – The management of steel industry in the context of durable development. *Annals of Faculty Engineering Hunedoara-International Journal of Engineering*, 14, 4.
- Centre Technique et de Promotion des Laitiers sidérurgiques (2018)** – Statistiques 2018.

## **Chapitre 3. Objectifs du travail**

3.1. Problématiques environnementales liées aux dépôts de laitiers

3.2. Domaines actuels de valorisation

3.3. Le projet ANR HYPASS

## Chapitre 3: Objectifs du travail

### 3.1. Problématiques environnementales liées aux dépôts de laitiers

Au cours du siècle dernier, d'énormes quantités de scories d'acier ont été massivement stockées dans des décharges à ciel ouvert, généralement laissées à nu et sans aucune mesure de protection. En conséquence, ces terrils sont exposés au vent et aux pluies, ce qui provoque leur érosion et leur lixiviation : Les transferts de métaux qu'il en résulte peuvent affecter les milieux bordant ces sites ainsi que les populations humaines ou d'autres êtres vivants. En particulier, la combinaison d'un pH extrêmement alcalin et de teneurs élevées en Cr, Mo, V, Cu, Ni, Al et/ou Zn constitue des problèmes typiques observés sur les lixiviats des décharges de scories d'acier. Ainsi, les eaux souterraines à proximité des décharges de scories sont souvent dégradées en termes de chimie des ions majeurs et de teneur en métaux lourds (Bayless et Schulz, 2003 ; Roadcap *et al.*, 2005 ; Mayes *et al.*, 2008 ; Gomes *et al.*, 2016). La plupart des dépôts de scories nécessitent donc le développement de modes de gestion durables pour limiter leur impact environnemental.

### 3.2. Domaines actuels de valorisation

D'anciens dépôts de scories gallo-romains ont constitué des gisements exploitables lors du XXème siècle (*cf.* 1.2.a) § 1.). Ainsi, un déchet sidérurgique de l'époque peut constituer les matières premières d'aujourd'hui. Historiquement, les sidérurgistes se débarrassaient des laitiers en les évacuant par wagons dans des zones de stockage où se formaient des terrils. La prise de conscience de la qualité intrinsèque de ces matériaux a permis l'émergence de filières de valorisation qui se sont organisées depuis les années 1930. Les laitiers représentent des ressources naturelles industrielles pérennes et soumises à une assurance qualité. Initialement utilisés en génie civil (remblais, ballasts, *etc.*) ou comme amendement minéral basique en agriculture (*cf.* 1.1.a) § 2.), les domaines d'application sont aujourd'hui plus variés (Galkin *et al.*, 1998; Das *et al.*, 2007 ; Yi *et al.*, 2012 ; Wei *et al.*, 2014). En raison de leurs caractéristiques granulométriques et mécaniques, les laitiers cristallisés de BF sont largement utilisés en tant que granulats pour bétons ou enrobés bitumineux. Il en est de même pour les laitiers de BOF, qui trouvent également une utilité en agriculture de par leur richesse en chaux. Lorsqu'ils

sont brusquement refroidis, les laitiers de BF se vitrifient. Les laitiers granulés qu'il en résulte conservent ainsi un fort potentiel de prise hydraulique. Ceux-ci sont donc valorisables comme additifs pour la fabrication de ciments. D'autres voies de valorisation existent dans les industries du verre, de la céramique et de la terre cuite ou encore pour la fabrication de laine minérale ou d'abrasifs. Certains laitiers restent cependant difficilement valorisables. A titre illustratif, l'industrie sidérurgique chinoise a généré 100 millions de tonnes de laitiers d'aciérie en 2014 et seulement 10% ont pu être réutilisées (Yu, 2018). La valorisation des laitiers d'EAF, comme de ceux de BOF, pose en effet problème en raison de leurs teneurs élevées en oxyde de fer et en chaux libre. L'extraction des éléments métalliques qu'ils contiennent pourrait néanmoins s'avérer intéressante, et ce tant d'un point de vue économique qu'écologique.

### 3.3. Le projet ANR HYPASS

Le projet HYPASS (HYdrometallurgy and Phytomanagement Approaches for Steel Slag management) relève de la thématique du traitement et de la valorisation de laitiers d'aciéries électriques. Il vise à proposer des solutions durables, intégrées et économiquement rationnelles pour répondre à l'ensemble des problématiques posées par ces matières, depuis leur prise en charge sur site jusqu'à leur évacuation et valorisation en voie « matériaux ». L'étude des impacts environnementaux et sanitaires de cette filière de valorisation émergente fait partie intégrante du projet. Son objectif est double : D'une part, il vise à développer un procédé permettant la récupération des métaux d'intérêts contenus dans les laitiers sidérurgiques. Il a d'autre part vocation à gérer les terrils métallurgiques de manière plus écologique. Dans cette optique, HYPASS s'intéresse à : i) la caractérisation des stocks existants de laitiers, ii) développer un procédé couplant principes physiques et hydrométallurgiques en conditions alcalines afin d'extraire les ressources métalliques qu'ils renferment, iii) explorer la phytostabilisation comme méthode de gestion des décharges sidérurgiques. Le but ultime du projet est de développer une procédure de gestion « zéro déchets » se voulant économiquement et environnementalement viable. Par ailleurs, HYPASS envisage de répertorier et de cartographier les anciens crassiers, de réaliser des « Analyses de Cycle de Vie » (ACV) sur les différentes méthodes de valorisation et de construire un outil d'aide à la décision facilitant le choix des traitements les plus adaptés. La méthodologie HYPASS est mise en œuvre sur le crassier métallurgique d'IFAM, situé à Châteauneuf (Loire) (*cf.* 1.2.b ).

Ces travaux de thèse visent à développer l'approche de phytomanagement des laitiers d'acier. Le site d'étude (cf. 2.2. b) est vaste, situé en périphérie urbaine et présente des concentrations très élevées en éléments métalliques. Ainsi, les méthodes conventionnelles de dépollution ne sont pas adaptées à son traitement. De par la quasi-absence de vie sur ce substrat, le site n'offre aucune fonction biologique. La phytostabilisation assistée par bioaugmentation, en plus de présenter un coût dérisoire d'implémentation et de lutter contre l'artificialisation des sols, apparaît alors comme une solution prometteuse. Afin d'optimiser le procédé développé, une attention particulière doit être apportée à la disponibilité des composantes de phytomanagement, qu'ils s'agissent de l'amendement ou encore des semences employées. Les techniques utilisées et la méthode développée lors de ces travaux pourront également être transposées à d'autres friches métallurgiques, en France ou ailleurs.

## References

- Bayless, E.R. and Schulz, M.S. (2003)** – Mineral precipitation and dissolution at two slag-disposal sites in northwestern Indiana, USA. *Environmental Geology*, 45:252-261.
- Galkin, M.P., Larionov, V.S., Stepanov, A.V., Nebol'sin, V.A., Milovanov, I.F. and Nikitin, G.S. (1998)** – Use of steelmaking slags. *Metallurgist*, 42, 9.
- Das, B., Prakash, S., Reddy, P.S.R. and Misra, V.N. (2007)** – An overview of utilization of slag and sludge from steel industries. *Resources, Conservation and Recycling*, 50:40-57.
- Yi, H., Xu, G., Cheng, H., Wang, J., Wan, Y. and Chen, H. (2012)** – An Overview of Utilization of Steel Slag. *Procedia Environmental Sciences*, 16:791-801.
- Wei, Y.L., Lin, C.Y., Cheng, S.H. and Wang, H.P. (2014)** – Recycling steel-manufacturing slag and harbor sediment into construction materials. *Journal of hazardous Materials*, 265:253-260.
- Yu, Q.H. (2018)** – Metal Recovery from steelmaking slag. *Doctoral thesis, University of Toronto,* *Toronto.*





## **Chapitre 4. Le laitier d'Industeel France ArcelorMittal**

### **4.1. Composition chimique des laitiers**

*a) Comparaison des compositions chimiques des laitiers de fer, d'acier et d'IFAM*

*b) Caractérisation granulométrique du laitier d'IFAM*

### **4.2. Caractérisation morphologique et minéralogique du laitier d'IFAM**

## Chapitre 4. Le laitier d'Industeel France ArcelorMittal

Chaque laitier peut être considéré comme un matériau unique du point de vue de sa composition car elle dépend des procédés sidérurgiques de production employés. Ainsi, la caractérisation chimique, minéralogique et environnementale des laitiers d'aciérie constitue une première étape pour orienter les choix de gestion et de valorisation. Ce chapitre a donc vocation à appréhender les propriétés physico-chimiques du laitier du site d'étude. Une comparaison de sa composition chimique totale avec celle de différents laitiers permet dans un premier temps d'identifier les procédés de production lui ayant donné naissance. Celle-ci, en plus de la caractérisation de sa distribution granulométrique et de ses phases minérales le constituant, doit permettre d'identifier les éléments valorisables qu'il renferme ainsi que ceux susceptibles d'impacter l'environnement et donc le procédé de phytomanagement à développer.

### 4.1. Composition chimique des laitiers

#### *a) Comparaison des compositions chimiques des laitiers de fer, d'acier et d'IFAM*

La composition des laitiers est dominée par le Ca et le Si avec des quantités relativement élevées de Fe, Mg et Al. Parmi les phases les plus fréquemment signalées dans les laitiers se trouvent des silicates de type olivine, riche en Ca ou de type mélilite, contenant Al ou Mg, mais également divers oxydes (Piatak *et al.*, 2015). De la calcite, divers sulfures ainsi que des traces de métaux purs sont également typiquement rencontrés. Piatak *et al.* (2015) ont passé en revue la composition des laitiers de près de 70 sites métallurgiques, ces résultats ont été utilisés pour la comparaison avec le laitier d'IFAM. La composition du laitier d'IFAM a été analysée par spectrométrie d'émission atomique à source plasma [« Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry » (ICP-AES)]. Le tableau III présente les valeurs minimales, maximales et moyennes des dosages d'oxydes, de métaux et de perte au feu (LOI) réalisés sur les laitiers de Fe, d'acier (Piatak *et al.*, 2015) et d'IFAM.

**Tableau III : Résumé de la chimie des éléments majeurs, mineurs et traces par type de laitier de près de 70 études (Piatak *et al.*, 2015) comparées à celles obtenues sur le laitier d'IFAM (n = 10)**

Laitiers	Fe			Acier			IFAM		
Valeurs	Min.	Max.	Moy.	Min.	Max.	Moy.	Min.	Max.	Moy.
Oxydes et LOI (wt.%)									
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,9	41,2	14,3	0,02	44,3	7,5	10,2	15,4	12,7
CaO	0,15	93,4	36,1	1,6	70,1	34,9	8,9	18,4	13,1
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,02	13,6	1,6	1,1	50,9	22,9	14,3	24,0	19,4
K <sub>2</sub> O	0,08	5,06	0,99	0,01	3,89	0,24	0,27	0,39	0,33
MgO	1,7	19,6	8,8	0,43	19,9	7,2	2,4	3,7	2,9
MnO	0,01	26,0	1,9	0,20	21,5	4,3	1,1	3,4	2,0
Na <sub>2</sub> O	0,09	2,7	0,49	0,02	0,57	0,16	0,42	0,66	0,55
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	-	-	-	-	-	0,14	0,22	0,18
SiO <sub>2</sub>	26,6	46,1	35,3	0,03	61,1	16,9	34,4	51,9	37,3
TiO <sub>2</sub>	0,02	3,7	0,63	0,12	2,0	0,66	0,29	0,36	0,33
LOI	0,10	4,5	1,9	0,20	11,2	3,6	4,3	5,3	4,9
Métaux (mg/kg)									
Ba	180	1110	557	24,0	1800	366	137	166	150
Co	0,03	33,0	9,5	0,80	36,0	7,9	12,0	16,4	14,2
Cr	0,10	9580	1032	4,0	32700	4798	3864	10896	6861
Cu	0,13	54,0	15,9	3,0	540	114	380	595	476
Mo	-	-	-	-	-	-	122	345	209
Ni	0,30	68,0	14,4	0,90	3180	153	249	375	308
V	-	-	-	-	-	-	204	401	288
W	-	-	-	-	-	-	15	204	97
Zn	0,15	320	79,5	1,0	11000	748	471	616	524

Les laitiers de Fe et d'acier présentent des teneurs en CaO généralement plus élevées que celles mesurées sur le laitier d'IFAM (environ 35 % du poids total des laitiers de Fe et d'acier contre les 13 % du laitier d'IFAM). Les laitiers de Fe ont des teneurs moyennes

en  $\text{SiO}_2$  et en  $\text{Al}_2\text{O}_3$  plus élevées que les laitiers d'acier ( $\text{SiO}_2$  à 35 % et  $\text{Al}_2\text{O}_3$  à 14% pour les laitiers de Fe ;  $\text{SiO}_2$  à 17% et  $\text{Al}_2\text{O}_3$  à 8 % pour les laitiers d'acier). Ces tendances ne sont pas vérifiées sur le laitier d'IFAM, pour lequel ces teneurs correspondent plus à celles du laitier de Fe ( $\text{SiO}_2$  à 37 % et  $\text{Al}_2\text{O}_3$  à 13 %). Les laitiers d'acier et d'IFAM présentent des teneurs en  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  voisines (23 % et 19 % respectivement) qui sont bien supérieures à celle des laitiers de Fe ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  à 2 %). La teneur moyenne en  $\text{MgO}$  du laitier d'IFAM est sensiblement inférieure à celles des autres laitiers (environ 9 % et 7 % dans les laitiers de Fe et d'acier, respectivement, contre 3 % dans le laitier d'IFAM). Les concentrations moyennes de  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{MnO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$  et  $\text{TiO}_2$  se situent dans les mêmes plages, tous laitiers confondus (variations de 0,2 à 1,0 % du pour  $\text{K}_2\text{O}$  ; 1,5 à 4,5 % pour  $\text{MnO}$  ; 0,1 à 0,6 % pour  $\text{Na}_2\text{O}$  ; 0,3 à 0,7 % pour le  $\text{TiO}_2$ ). Quant aux LOI, c'est le laitier d'IFAM qui présente la plus élevée, suivit par les laitiers d'acier puis de ceux de Fe (moyennes respectives de 4,9 %, 3,6 % et 1,9 % du poids total). En ce qui concerne les teneurs totales en métaux, les laitiers d'acier contiennent plus de Cr, Cu, Ni et Zn que les scories de fer. Ces différences prennent leur origine dans la phase d'affinage de l'acier, au cours de laquelle divers éléments d'alliage peuvent être ajoutés. Le laitier d'IFAM, en raison de sa teneur élevée en oxydes de Fe, en Cr, Cu, Ni et Zn, présente la plupart des caractéristiques d'un laitier d'acier (Tableau III) (Houecande *et al.*, 2016).

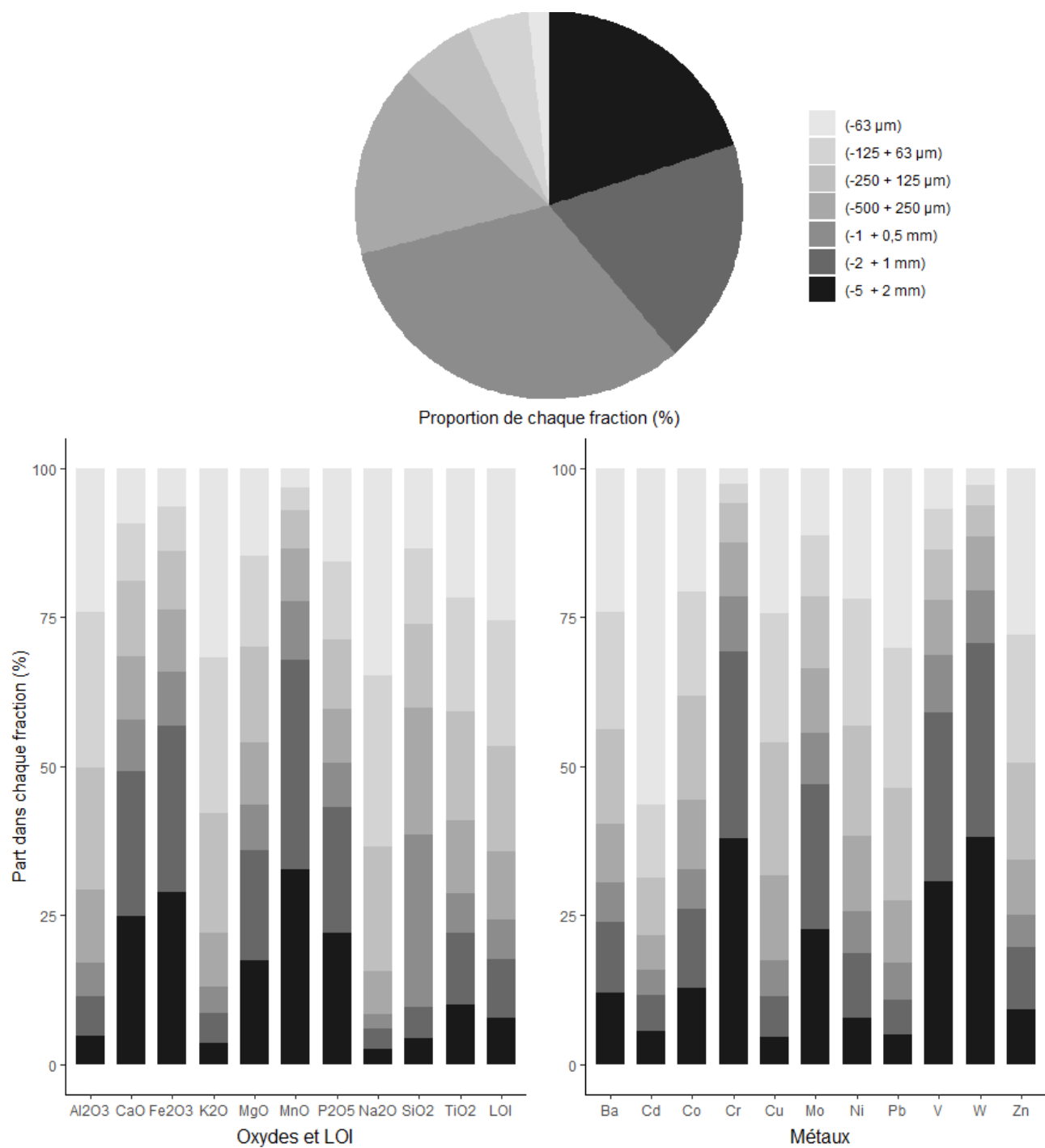
#### *b) Caractérisation granulométrique du laitier d'IFAM*

Le laitier d'IFAM a été soumis à des essais de tri granulométrique sur un échantillon tamisé sur place à 5 mm ayant permis de retirer les scories les plus grosses. Ces tris ont été réalisés à l'aide d'une tamiseuse automatique (amplitude : 0,4 mm, durée : 20 min par intervalles de 10 sec ponctué de pause de 2 sec). Ces tris ont permis la quantification massique des fractions granulométriques : (- 63  $\mu\text{m}$ ) ; (- 125 + 63  $\mu\text{m}$ ) ; (- 250 + 125  $\mu\text{m}$ ) ; (- 500 + 250  $\mu\text{m}$ ) ; (- 1 + 0,5 mm) ; (- 2 + 1 mm) et (- 5 + 2 mm). La fraction granulométrique la plus représentée est celle comprise entre 1 et 0,5 mm avec en moyenne 31,5% de la masse totale du matériau. Les fractions supérieures à 1 mm représentent 38,1% de la masse totale tandis que celles inférieures à 0,5 mm composent 28,5 % du laitier sidérurgique (Figure 9). Les échantillons relatifs à chaque fraction ont

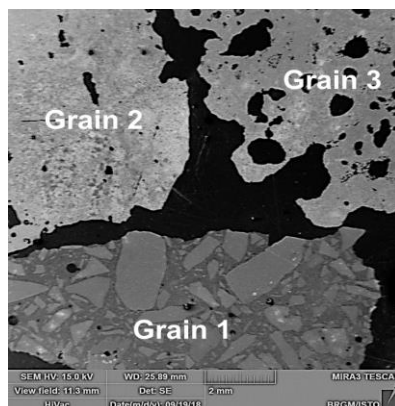
été mis en solution (fusion alcaline) et analysés par ICP-MS. La figure 9 présente les parts d'oxydes, de métaux et de LOI rencontrés dans chacune des fractions granulométriques triées. Celles-ci présentent des compositions hétérogènes. Les grains compris entre 1 et 5 mm concentrent environ 49 % du CaO total, 57 % du Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> total, 36 % du MgO total, 68 % du MnO total, 38 % du P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> total, 69 % du Cr total, 47 % du Mo total, 59 % du V total et 71 % du W total. Les grains compris entre 63 µm et 0.5 mm concentrent environ 83 % de l'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> total, 87 % du K<sub>2</sub>O total, 92 % du Na<sub>2</sub>O total, 71 % du TiO<sub>2</sub> total, 69 % du Ba total, 84 % du Cd total [dont 57% dans la fraction (- 63 µm)], 67 % du Co total, 83 % du Cu total, 74 % du Ni total, 83 % du Pb total et 75 % du Zn total. La fraction (- 5 + 1 mm) présente une LOI de 16 % alors que la LOI de la fraction (- 0.5 mm + 63 µm) est de 69 %. 67,3 % du SiO<sub>2</sub> se concentre dans la fraction majoritairement représentée en masse (- 1 + 0,5 mm). Ces résultats n'ont néanmoins pas permis de quantifier les fractions les plus grossières existantes sur le site.

#### 4.2. Caractérisation morphologique et minéralogique du laitier d'IFAM

La morphologie de trois différents grains de laitier d'IFAM a été déterminée par Microscopie Électronique à Balayage (MEB) (Figure 10). La collecte des électrons rétrodiffusés permet de faire apparaître en contraste les éléments en fonction de leur numéro atomique. Ainsi, les grains contenant les éléments les plus lourds apparaissent dans des tons plus clairs. La morphologie de chacun des grains observés est sensiblement différente à l'échelle microscopique. Le grain 1 apparaît en effet comme un agglomérat de particules de tailles comprises entre 0,3 et 2,0 mm, piégé dans une matrice fine. Les grains 2 et 3 sont constitués d'une matrice fine parsemée de porosités de tailles variables, approximativement comprises entre 0,1 et 1,0 mm. Les agglomérats ainsi que la matrice du grain 1 semblent essentiellement composés d'éléments légers par comparaison avec la matrice des grains 2 et 3, qui présentent des tons plus clairs.



**Figure 9** : Proportion massique et composition chimique de chaque fraction granulométriques triées

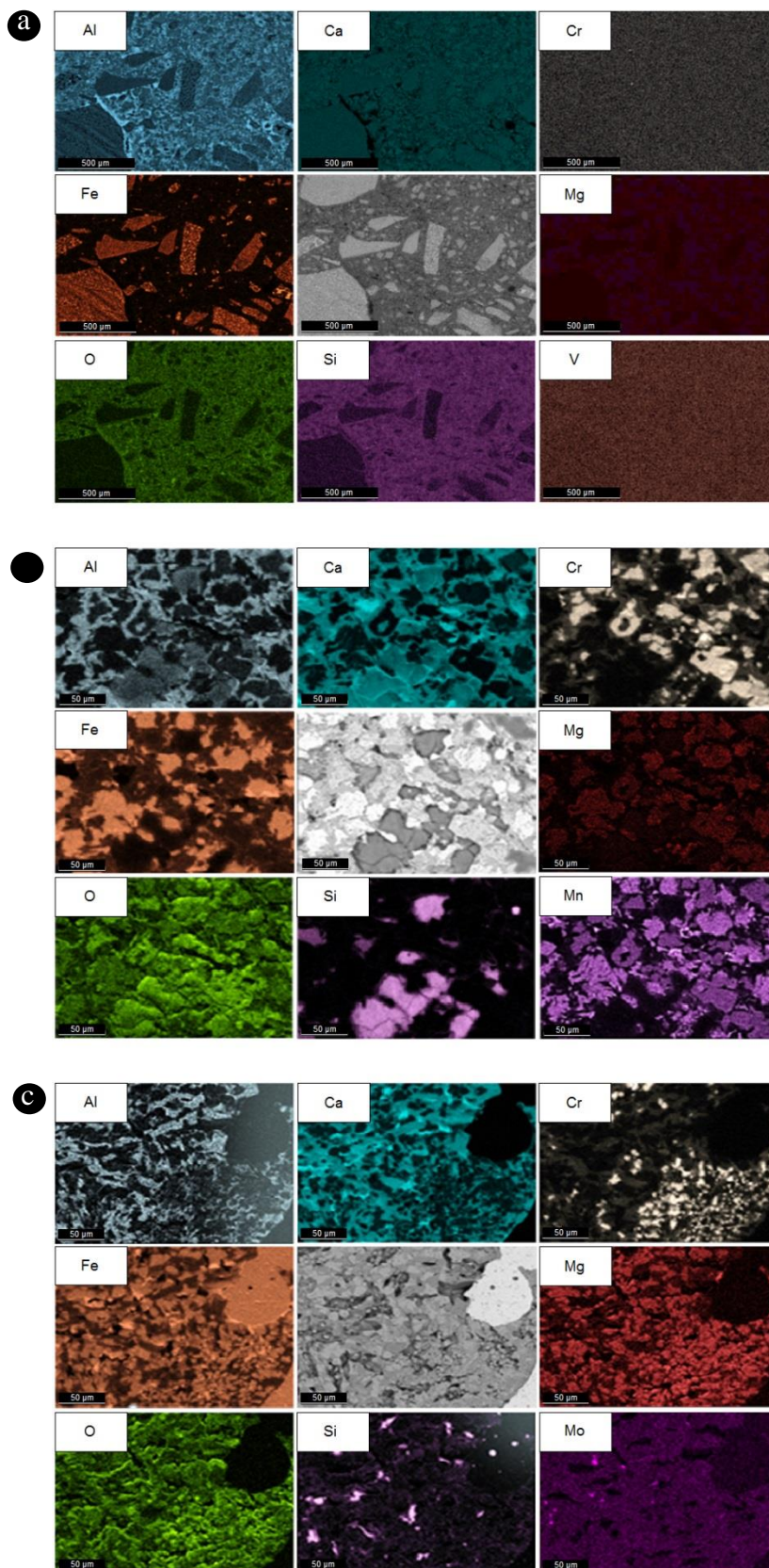


**Figure 10** : Caractérisation morphologique MEB de trois grains distincts de laitier d'IFAM

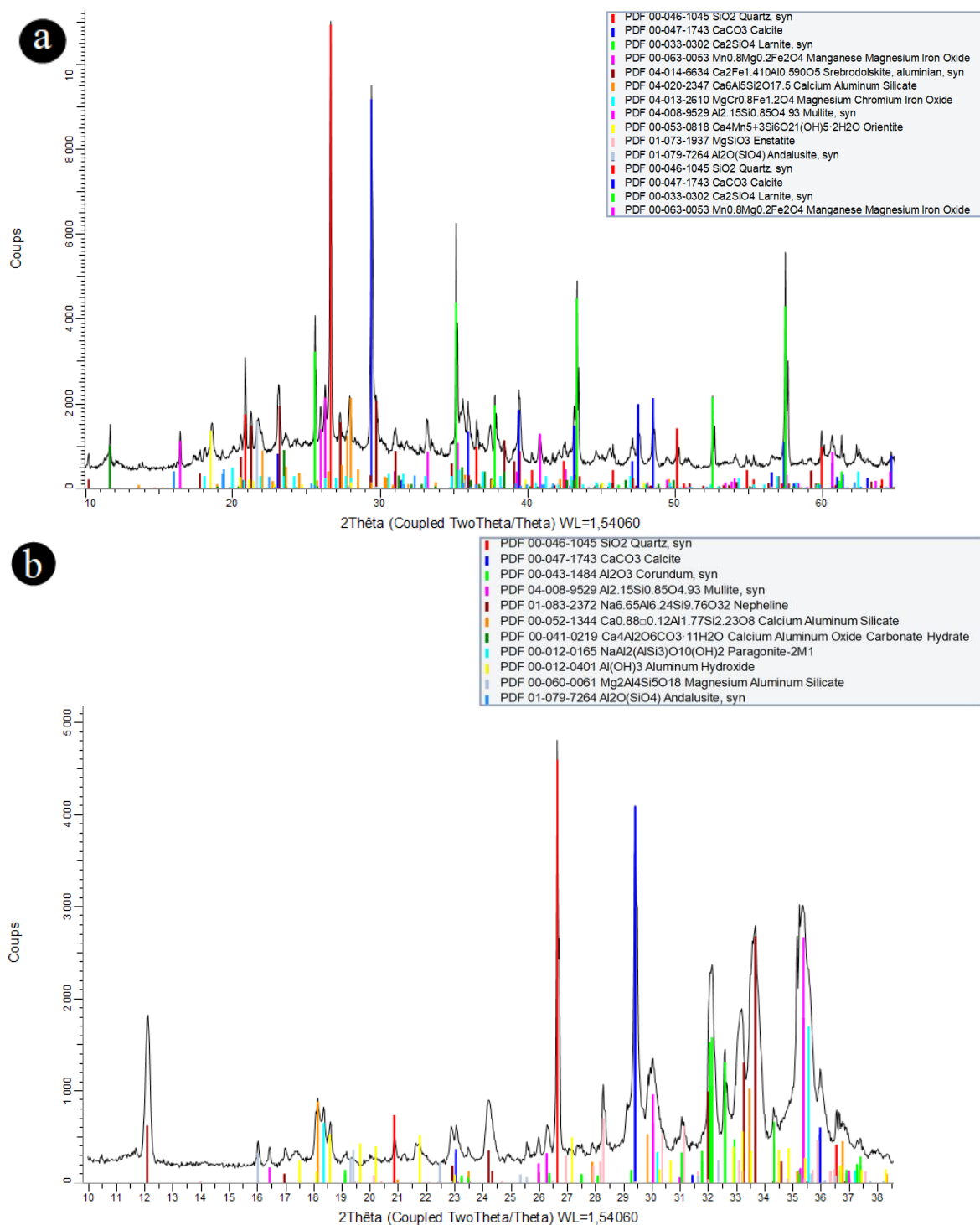
Un système de microanalyse par dispersion d'énergie [« Energy Dispersive x-ray Spectroscopy » (EDS)] intégré au MEB permet une visualisation qualitative de la distribution des éléments composant ces grains (Figure 11). Les cartes EDS ainsi obtenues mettent en évidence les disparités de compositions chimiques des trois grains de laitier d'IFAM. La distribution spatiale des éléments du grain 1 (Figure 11a.) permet d'établir clairement une corrélation entre Al et Si. Ceci semble indiquer la présence de composés de type aluminosilicates. La distribution spatiale de ces éléments est logiquement corrélée à O. Aucune distribution particulière ne semble se dessiner pour les éléments V et Cr, qui apparaissent en de très faibles quantités. Al est peu présent dans les grains à forte proportion en Fe. Le Ca se répartit relativement uniformément dans le grain et semble s'associer avec chacun des éléments précédemment listés. La distribution spatiale des éléments du grain 2 (Figure 11b.) indique une corrélation entre Ca et Si dans des particules faiblement chargées en Al, suggérant de potentielles phases de type larnite ( $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ). Ca et Al sont quant à eux corrélées dans les particules contenant le moins de Fe. Cette carte évoque également une corrélation partielle entre Cr et Mn : Certains grains sont en effet moyennement chargés en Mn et le sont fortement en Cr. Par ailleurs, des grains faiblement chargés en Cr existent, indiquant la présence d'au moins deux types de phases porteuses de Cr. L'association des phases faiblement concentrées en Fe avec celles fortement chargées en Cr suggère qu'il pourrait s'agir de phases de type chromite ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ). Dans les grains faiblement chargés en Cr, une corrélation se dessine également entre Al, Ca et Cr, rendant probable l'existence d'une phase inconnue de type



alumino-calcique porteuse de Cr. Les particules les plus chargées en Fe et en Mn sont associés. Finalement, la distribution spatiale de tous les éléments est là encore logiquement corrélée avec O, les phases minérales mentionnées étant des espèces d'oxyde. La distribution spatiale des éléments du grain 3 (Figure 11c.) montre que les particules faiblement chargées en Cr le sont aussi en Fe. Pourtant, les particules riches en Fe ne semblent pas contenir de Cr et inversement. Comme dans le grain 2, une corrélation partielle semble exister entre Ca, Al et Cr dans les particules faiblement chargées en Cr. Dans ce grain comme dans le grain 1, le Fe ne semble pas fortement associé à O, contrairement aux autres éléments. Une analyse minéralogique DRX révèle les principales phases cristallines présentes dans les fractions granulométriques les plus grossières (-5 +2 mm) et les plus fines (-63 µm) du laitier d'IFAM (Figure 12). Des minéraux représentatifs d'au moins deux sources sont rencontrés dans chacune des fractions. D'une part, essentiellement dans la fraction la plus grossière, se trouvent des phases caractéristiques des laitiers de fusion: La larnite ( $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ), la wüstite ( $\text{FeO} - \text{MgO} - \text{MnO}$ ), la srebrodolskite ( $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ ) ainsi qu'une phase oxydée de FeMgCr, correspondant potentiellement à un spinelle. D'autre part, dans les fractions les plus fines sont rencontrés des phases caractéristiques des réfractaires : la mullite, le corindon, l'andalousite et la néphéline. Cette dernière a été décrite comme produit de réaction entre laitier et le revêtement réfractaire des creusets. La principale source de quartz proviendrait plutôt du sable utilisé pour le refroidissement des tôles et non des laitiers ou des réfractaires. Par ailleurs, la présence de minéraux d'altération, telle que la calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) est notable dans chacune des fractions analysées.



**Figure 11** : Composition chimique semi-qualitative MEB/EDS de trois grains distincts de laitier d'IFAM : grain n°1 (a), grain n°2 (b), grain n°3 (c)



**Figure 12:** Composition minéralogique DRX des fractions (-5 +2 mm) (a) et (-63 µm) (b) préalablement broyées à (-63 µm)

## References

- Piatak, N.M., Parsons, M.B. and Seal, R.R. (2015).** Characteristics and environmental aspects of slag: A review. *Applied Geochemistry*, 57:236-266.
- Houecande, O. (2016).** Chimie de l'eau et transport particulaire dans un crassier sidérurgique: de la zone non saturée à la zone saturée. *Thèse de doctorat, Mines Saint-Etienne, Saint-Etienne*.

Le programme PHYSAFIMM a démontré qu'une végétalisation des terrils sidérurgiques était possible. Cela implique un travail suffisant du technosol, en apportant du MIATE sur une dizaine de centimètres, ainsi que l'utilisation d'un mélange d'espèces adaptées aux contraintes pédogéochimiques observées sur le terril. Le procédé adopté a également montré son efficacité pour limiter les transferts d'ETs tant vers le couvert végétal que vers les milieux environnants le site. Les parcelles les plus végétalisées annulent le transport éolien de particules et le bilan hydrologique a montré qu'elles permettaient de réduire significativement les eaux s'infiltrant dans le terril. La phytostabilisation apparaît donc comme une solution efficace pour la réhabilitation des terrils sidérurgiques. Malgré cela, les teneurs en Cr et Mo mesurés dans les tissus foliaires restent très élevées. De plus, l'hétérogénéité des couvertures végétales obtenues suggèrent que certains obstacles à la colonisation des plantes restent méconnus et donc non contrôlés. Les composantes du procédé de phytostabilisation doivent donc être développées, notamment en s'adressant particulièrement aux processus géochimiques ayant cours lors de la phase d'amendement du technosol.

**Chapitre 5: Aided-phytostabilization of steel slag dumps: the key-role of pH  
adjustment in decreasing chromium toxicity and improving manganese, phosphorus and  
zinc phytoavailability**

**Mathieu Scattolin<sup>1</sup>, Steve Peuble<sup>1</sup>, Fernando Pereira<sup>1</sup>, Frédéric Paron<sup>1</sup>, Jacques Moutte<sup>1</sup>, Nouredine Menad<sup>2</sup> and Olivier Faure<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Moulin, Univ Lumière, Univ Jean Monnet, ENTPE, INSA Lyon, ENS Lyon, CNRS, UMR 5600 EVS, Centre SPIN, Département PEG, F - 42023 Saint-Etienne, France

<sup>2</sup>BRGM, Water, Environment Process and Analysis, Waste and Raw Materials & Recycling Unit, 3 Avenue Claude Guillemin, BP 36009, 45060 Orléans Cedex, France

*\*Corresponding author.*

*Olivier Faure*

*Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Moulin, Univ Lumière, Univ Jean Monnet, ENTPE, INSA Lyon, ENS Lyon, CNRS, UMR 5600 EVS, Centre SPIN, Département PEG, 158 cours Fauriel, F - 42023 Saint-Etienne Cedex2, France*

*Email: [ofaure@mines-stetienne.fr](mailto:ofaure@mines-stetienne.fr)*

*Phone: +33 477 420 206*

**Article accepté en Octobre 2020 (Journal of Hazardous Materials)**

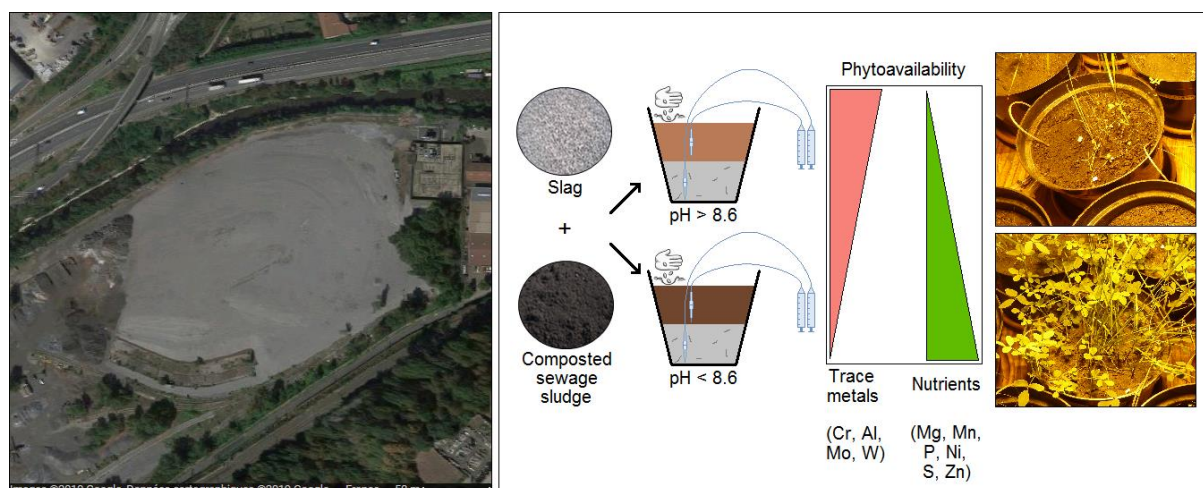


## Abstract

Because of their high content in toxic metals, steel slag dumps are potential threats for the environment and public health. Among management methods that could mitigate their hazard, aided-phytostabilization is a relevant, though challenging, option. Indeed, steel slags are very unfavorable for plant growth, due to metal toxicity and very alkaline pH (>10). In this work, we investigated how composted sewage sludge could alleviate slag's toxicity while improving its nutritional status. A pot experiment was performed to study biomass production and leaf ionome composition of five herbaceous species (*Achillea millefolium*, *Bromus erectus*, *Festuca arundinacea*, *Melilotus officinalis* and *Medicago sativa*), in relation to soil pore water's pH, concentration of trace and major elements and their chemical speciation. Results showed that pH had a clear-cut effect on plant development. Above pH 8.6, plant biomass was severely affected, due to accumulation of Cr above toxic threshold and deficiencies in Mn, Zn and P. Below pH 8.6, biomass increased significantly, together with a decrease in leaf Cr below toxic level, and an increase in Mn, Zn and P above deficiency levels. Thus, these results bring new insights into the causes of slag phytotoxicity and allow considering aided-phytostabilization as a realistic and efficient approach for the remediation of steel slag dumps, provided soil pH is carefully monitored before seeding.

## Keywords

Phytomanagement; Toxic metals; Nutrient deficiency; Chemical speciation; Plant ionome



## 1. Introduction

Steel slags are ubiquitous wastes generated by metallurgical industries during the purification of iron and its alloys. Although their precise composition depends on the process used for steel production, these slags are generally highly alkaline materials (pH >10) mainly composed of Al, Ca, Fe, Mg and Si, associated in various mineralogical forms such as lime, silicates and metal oxides (Piatak *et al.*, 2015). They also contain various levels of potentially harmful trace elements (TEs), such as Cr, Cu, Mn, Mo, Pb, V, W and Zn.

Since the industrial revolution, the massive steel demand led to the production of huge quantities of slags, that were mainly stored as open dumps, often left bare without any protective measures. Consequently, most slagheaps are exposed to wind and rainfalls, causing them to weather and leach. They are therefore a source of hazard, due to potential metal transfers toward the atmosphere, surrounding soils, surface and ground waters, and ultimately human populations or other biological targets. Indeed, several studies have pointed out a degradation of water quality in the vicinity of slag dumps, due to high levels of Al, Cr, Mo, V, Ni, Pb, and/or Zn in slag's leachates (Bayless and Schulz, 2003; Roadcap *et al.*, 2005; Mayes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2016). Thus, slag deposits and their leachates are requiring the development of sustainable ways of management for limiting their environmental impact. In this respect, plant-based approaches, *i.e.* phytostabilization (Kidd *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017) and constructed wetlands (Gomes *et al.*, 2019) could constitute relevant options.

The main goal of phytostabilization is to mitigate pollutants transfers, by implementing a homogenous plant cover without bringing an extra layer of clean soil (Mendez and Maier, 2008; Vamerali *et al.*, 2010; Kidd *et al.*, 2015). This approach has at least three advantages. Firstly, vegetated soils are far less prone to mechanical erosion than bare ones, thereby limiting dispersion of contaminated dusts. Second, plants intercept a significant amount of water, thereby limiting leaching of pollutants towards groundwater. Third, root exudates released by plants in their rhizosphere promote the development of complex communities of microbes (bacteria and fungi), which are key players in many soil functions (Nannipieri *et al.*, 2003), including organic matter dynamics and nitrogen and phosphorus cycling. These microorganism-driven transformations speed up the so-called soil aging effect (Alexander, 2000), which generally decreases the (bio)availability (Semple *et al.*, 2004; AFNOR, 2008) of organic and metal pollutants in the soil (Lock and Janssen, 2003; Remon *et al.*, 2013).



During the last decade, several studies have addressed the issue of phytostabilization of slags derived from various metallurgical processes, *e.g.* zinc smelting (Luo *et al.*, 2018, 2019, 2020), lead smelting (Ramos da Silva *et al.*, 2017), copper smelting (Agnello *et al.*, 2018), and iron and steel smelting (Bouchardon *et al.*, 2014; Oustriere *et al.*, 2016). All these studies emphasized that plant growth on metallurgical slags must overcome severe edaphic constraints. Indeed, besides the potential toxicity of metal elements, slags are almost devoid of organic matter and major nutrients, such as nitrogen and potassium. They also have a sandy texture, leading to a very low water holding capacity that impairs seeds germination and plantlets development. Moreover, an additional feature of steel slag, as compared to Zn, Pb and Cu slags, is its highly alkaline pH ( $> 10$ ) that is very unfavorable for plant establishment. However, Bouchardon *et al.* (2014) and Oustriere *et al.* (2016) demonstrated that bringing composted sewage sludge (CSS) (at an amount of 120 T/ha and mixed with the 10 top centimeters of the slag), was a cheap and efficient treatment to promote plant development on steel slags, provided that an assemblage of adapted species (drought tolerant, calcicolous, pseudo-metallophyte species) was sown. By contrast, application of an inorganic NPK fertilization was ineffective on plant growth, as compared to control plots. Although these authors hypothesized that the alleviation of slag's toxicity by CSS could be due to the lowering of soil pore water (SPW) pH and the improvement of the plants' nutritional status, these mechanisms were not further investigated. Yet, a comprehensive characterization of the main parameters governing plant establishment on steel slags is mandatory for the successful implementation of phytostabilization at a large scale.

Actually, whether soil elements are toxic or essential for plants, their uptake by roots (*i.e.* their phytoavailability), and thus their inhibitory or beneficial effects on growth and development, depends on their solubility, *i.e.* their partitioning between the soil solid phases and the pore water (Ge *et al.*, 2000). This is, in turn, strongly influenced by soil properties (*e.g.* pH, redox potential, cation exchange capacity) and by interactions between chemical species in the SPW (*e.g.* precipitation *vs* dissolution).

Therefore, in this study, we hypothesized that the beneficial effect of CSS amendment, in addition to its role in macronutrient supply, could be primarily due to a pH-induced change of elements' solubility in SPW. This could decrease the mobility of potentially toxic metal species, while increasing the availability of essential nutrients. To test this hypothesis, we performed a pot experiment using a gradient of CSS amendment and we studied element

concentration and speciation in the soil pore water and their accumulation in plants, in relation to slag's pH.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Slag and CSS characteristics*

The slag used in this study was collected from a metallurgical landfill (45°26' N, 4°17' E) located at Châteauneuf (France). This slagheap had received the by-products of a neighboring steel and iron smelting plant from ca. 1860 to 2001, and contained approx. 500,000 m<sup>3</sup> of slags, spread over an area of about 5 ha and a height of 10 m. About 300 kg of slag was taken at the surface of the slagheap (0 - 10 cm depth).

The CSS used for slag amendment was purchased from a specialized producer (Terralys Inveko, Les Allerys, St Priest la Roche, France).

For plant culture experiments, both slag and CSS were sieved to 5 mm, and air-dried until constant weight. Slag was then thoroughly mix with a ciment mixer.

For the determination of the main agronomic characteristics of slag and CSS, dry sub-samples (approx. 1 kg) were sieved to 2 mm. The selected following parameters were analyzed: cation exchange capacity (CEC) (NF X31-130), total organic carbon (TOC) (NF ISO 14235), total nitrogen (NF ISO 11261), pH in water (NF ISO 10390), particle size distribution (NF X31-107), total CaCO<sub>3</sub> (NF ISO 10693), active CaCO<sub>3</sub> (NFX 31-106) and exchangeable phosphorus (NF ISO 11263). All analyses were performed at the "Laboratoire Agronomique de Normandie" (LANO, St-Lô, France), according to the standardized working procedure NF EN ISO/CEI 17025.

For the determination of elemental composition of slag and CSS, samples (approx. 1 g) were finely powdered with an agate mortar and then calcinated at 960°C for 2 hours in platinum crucibles, before digestion by alkali fusion. Fusion beads were made using a fusion machine (xrFuse 2, XRF Scientific Ltd, Australia), by fusing 200 mg of calcinated sample with 1.5 g LiBO<sub>2</sub> plus a few drops of LiBr. Beads were then dissolved in 100 ml 2M HNO<sub>3</sub>, before ICP-OES analysis (Horiba Jobin Yvon, Activa).

The selected characteristics of slag and CSS are given in Table 1.

## 2.2. Plant culture experiments

A pot experiment was performed in order to better understand the influence of slag amendment with CSS, on soil pore water pH, element speciation, and plant growth. For this purpose, plastic pots (20 cm  $\varnothing$  x 20 cm) were first filled with 3 kg of dry slag (approx. 10 cm in high), and then completed with a 10 cm layer of slag mixed with CSS. This two-layers system was used to mimics field conditions as close as possible. Two levels of CSS were used: 60 T/ha (*i.e.* 180 g CSS/pot) and 120 T/ha (*i.e.* 360 g CSS/pot). Control pots were filled with 5 kg of slag and did not receive any amendment. During pot preparation, two soil pore water samplers (Rhizon flex®, Rhizosphere Research Products, The Netherlands) were inserted with an angle of 45° in both layers of each pot. Pots were then watered with deionized water (2 M $\Omega$ .cm), up to 70% of the substrate water holding capacity (WHC); they were left in equilibrium with the atmosphere for two weeks at room temperature. During this period, pots were watered with deionized water every two days, taking care to avoid leaching. Sowing was then performed two weeks after pots' preparation, using the same seed assemblage as recommended by Bouchardon *et al.* (2014), *i.e.* *Achillea millefolium* L., *Bromus erectus* Huds, *Festuca arundinacea* Schreb., *Melilotus officinalis* (L.) Lam., and *Medicago sativa* L.. These species belonged to three botanical families (*Asteraceae*, *Fabaceae* and *Poaceae*) and were selected because they were known as drought tolerant, calcicolous, pseudo-metallophyte species. The seed density was 6 g/m<sup>2</sup> (*i.e.* 200 mg per pot) with the following mass proportions for each species: 45% for *B. erectus*, 25% for *F. arundinacea*, 12.5% for *M. officinalis* and *M. sativa*, and 5% for *A. millefolium*.

Pots were placed in the greenhouse for 75 days (photoperiod 14h light: 10h dark, 700 $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s, temperature 25°C day-20°C night). They were watered with deionized water about three times a week, to maintain substrate's humidity at 70% WHC while avoiding leaching of the substrate.

The experiment was performed as a completely randomized design with ten replicates per treatment.

### *2.3. Soil pore water sampling and analysis*

SPW was sampled (approx. 5 mL) from both rhizons of each pot at the day of sowing (day-0). The pH of each SPW sample was immediately measured using a Consort C832 pH-meter equipped with a combined glass electrode. For trace element determination, SPW samples were diluted 5 times in ultrapure water ( $> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ). Analyses were performed by ICP-MS (Agilent Technology 7800 ICP MS) using calibration curves made with certified multi-element standards (PlasmaCAL, SCP Science). Limits of quantification were 1 nM for Cd, As, and W; 5 nM for Pb and V; 10 nM for Mn and Cr; 50 nM for Ni, Mo, Cu and Zn; 200 nM for P and Al; 500 nM for Mg and Fe; 1  $\mu\text{M}$  for Na and K; 1.5  $\mu\text{M}$  for Ca; 9  $\mu\text{M}$  for S. The relative standard deviation between replicate samples was less than 5%. For each pot, data presented in both text and figures are the average of the two rhizons.

### *2.4. Plant harvest and analysis*

After 75 days of culture, shoots from all plants present in each pot were harvested. They were thoroughly washed with tap water, rinsed with deionized water, and dried at  $60^\circ\text{C}$  until constant weight. Total shoot dry weight (DW) per pot was then recorded for each species. Additionally, leaves from each species were taken for ionome analysis. For this purpose, 100 mg dry leaf samples were first pre-digested in 1 mL  $\text{HNO}_3$  (65%, sub-boil distilled analytical grade) at  $60^\circ\text{C}$  during 1 hour; 200  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (35%, analytical grade) was then added and pre-digestion was continued at  $90^\circ\text{C}$  for 1 hour. After the pre-digestion step, 1 mL  $\text{HNO}_3$  was added again and samples were heated at  $125^\circ\text{C}$  for 24h. Finally, 200  $\mu\text{L}$  HF (analytical grade, 5% V/V in ultrapure water) was added, and samples were evaporated to dryness at  $95^\circ\text{C}$ . The final residue was then diluted in 25 mL  $\text{HNO}_3$  (1%, V/V in ultrapure water). Digested samples were analyzed by ICP-MS (Agilent Technology 7800 ICP MS). Limits of quantification were 0.2 mg/kg for Mo and W; 0.5 mg/kg for Mn and Ni; 1 mg/kg for Cr; 7 mg/kg for Zn; 10 mg/kg for Mg and Al; 100 mg/kg for P; 200 mg/kg for S. For the quality assurance of plant mineralization and analysis, the certified reference material CTA-OTL1 (Oriental Tobacco Leaves), ERM-CD81 (Rye Grass) and BCR-482 (Lichen) were used in each digestion series. Mean percent recovery were the following: Al 108%; Cr 77%; Mg 98%; Mn 99%; Mo 87%; Ni 94%; P 96%; S 92%; W (not certified for the CRM used) and Zn 97%.

## 2.5. Geochemical modelling of elements' speciation in SPW

The speciation and chemical equilibrium of elements in SPW was determined using the Arxim code (Moutte, 2009). Calculations were performed by considering median chemical composition of the SPW for different pH ranges ([8.1-8.6], ]8.6-9.6], ]9.6-10.6] and ]10.6-11.6]), as measured at day-0; physical parameters for the model were fixed at:  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 10^5$  Pa, oxidizing conditions (that were those of experimental plant growing conditions). Formation constants for minerals and aqueous species were computed using the SUPCRT approach (Johnson *et al.*, 1992) based on data recently updated by Zimmer *et al.* (2016). This database was completed by equilibrium constants of the molybdate and chromate species (aqueous complexes and salts) extracted from the MINTEQ database (Allison, 1991).

## 2.6. Data exploration and statistical analyses

Visual exploration of univariate data was performed using the box-and-whiskers method. In every case, boxplots were drawn according to Tukey's approach (Tukey, 1977) [*i.e.* the bottom and the top of the box are the 1<sup>st</sup> (Q1) and 3<sup>rd</sup> (Q3) quartile of data distribution, while the line inside the box shows the median value. Whiskers are drawn to reach the lower (top whisker) and higher (bottom whisker) point of data distribution lying within the ranges  $(Q3 + 1.5 \text{ IQR})$  and  $(Q1 - 1.5 \text{ IQR})$ , respectively (with  $\text{IQR} = \text{interquartile range} = Q3 - Q1$ ). Points outside the whiskers are considered as outliers.

The effects of CSS addition and/or SPW's pH on plant biomass production and leaf metal contents were compared using Kruskal-Wallis' one-way ANOVA on ranks. When necessary, pairwise analyses were performed using the Wilcoxon rank sum test, with Holm's  $p$ -adjust method for multiple comparisons. Significance levels and associated symbols in graphical plots were the following:  $p > 0.1$ , non-significant (NS);  $0.05 < p < 0.1$ , poorly significant (\*);  $0.01 < p < 0.05$ , significant (\*\*);  $p < 0.01$ , highly significant (\*\*\*).

Multi-elemental composition of SPW was explored using principal component analysis (PCA) on standardized data. Relationships between individual elements in SPW and plant biomass production were explored by calculating Spearman's rank correlation coefficients and associated  $p$ -values.

All statistical calculations and plot drawings were performed using R software (R core Team, 2017) and the FactoMineR (Lê *et al.*, 2008) package.

**Table I:** Selected pedological and geochemical characteristics of the studied slag and composted sewage sludge (CSS)

Category	Parameter	Slag	CSS
Physical	pH	10.5	8.0
	CEC [cmol(+)/kg]	5.9	38.9
Grain size (%)	< 2000 $\mu\text{m}$ to 50 $\mu\text{m}$	96.1	36.2
	< 50 $\mu\text{m}$ to 2 $\mu\text{m}$	2.2	49.5
	< 2 $\mu\text{m}$ to 0 $\mu\text{m}$	1.7	14.3
Fertility (g/kg)	N	0.1	25.7
	TOC	43	295
	Active $\text{CaCO}_3$	20	480
	Total $\text{CaCO}_3$	304	136
Exchangeable macronutrients (g/kg)	$\text{P}_2\text{O}_5$	0.010	1.092
	$\text{K}_2\text{O}$	0.070	5.526
	$\text{CaO}$	9.84	13.43
	$\text{MgO}$	0.741	1.713
Bioavailable micronutrients (mg/kg)	Cu	1.2	7.3
	Fe	9.5	134.7
	Mn	7.4	66.0
	Zn	11.9	85.0
Major elements (g/kg)	$\text{Al}_2\text{O}_3$	127	92
	$\text{CaO}$	131	202
	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	194	95
	$\text{K}_2\text{O}$	3	41
	$\text{MgO}$	29	16
	$\text{MnO}$	20	10
	$\text{Na}_2\text{O}$	6	14
	$\text{P}_2\text{O}_5$	2	64
	$\text{SiO}_2$	437	462
Trace elements (mg/kg)	Cr	6861	157
	Cu	476	378
	Mo	209	< LQ
	Ni	308	36
	Pb	< LQ	< LQ
	V	288	56
	W	97	< LQ
	Zn	524	746

CEC: Cation-Exchange Capacity

TOC: Total Organic Carbon

### 3. Results

#### 3.1. CSS addition decreases SPW's pH

The pH of SPW, as measured at the time of sowing (day-0) in amended and non-amended slag, is given in Fig. 1a. Results showed that median values of SPW's pH had sharply decrease with CSS addition in slag, ranging from 11.2 for bulk slag (CSS0), to 9.1 at 60 T/ha CSS (CSS60), and up to 8.5 for slag with 120 T/ha CSS (CSS120). This decrease in SPW's pH was highly significant when comparing CSS0 with CSS60 or CSS120 ( $p = 5 \cdot 10^{-4}$ ) but was non-significant between CSS60 and CSS120 ( $p = 0.27$ ). It is noteworthy that, for a given experimental condition, SPW's pH was quite heterogeneous, ranging from 10.7 to 11.6 in CSS0, from 8.3 to 10.3 in CSS60 and from 8.1 to 9.6 in CSS120. Accordingly, sorting the overall pots by an ascending pH order (Fig. 1b) revealed an almost continuous curve of pH values within the range 8.1 to 11.6. Thus, observing points distribution on this curve allowed discriminating four pH ranges for experimental pots: 8.1 to 8.6 (including 5 pots of CSS60 and 5 of CSS120), 8.7 to 9.6 (including 5 pots of CSS120), 9.7 to 10.6 (including 5 pots of CSS60) and 10.7 to 11.6 (including the 10 pots of CSS0).

#### 3.2. Plant biomass is strongly reduced when SPW pH is above 8.6

Fig. 2a shows plant biomass, expressed as the total shoot dry weight (DW) per pot at the time of harvesting (day-75), in relation to CSS level in slag. Seeds sown on bulk slag (CSS0) did not germinated; consequently, no biomass was obtained at d-75. By contrast, CSS addition allowed seed germination and plant development, but no significant difference was evidenced between CSS60 and CSS120 ( $p = 0.35$ ). Median values of shoot biomass production in amended slag was about 6 g DW/pot but, for both CSS levels, a very high variability was observed between pots, with biomass values ranging from less than 1g to close to 15 g.

When shoot biomasses were plotted against SPW's pH ranges (Fig. 2b), a highly significant difference between groups was evidenced ( $p = 5 \cdot 10^{-6}$ ). Plants grown in pots with SPW's  $\text{pH} \leq 8.6$  were well-developed and reached about 13 g DW/pot. By contrast, the development of plants grown in pots with SPW's  $\text{pH} > 8.6$  was strongly reduced: within the pH range 8.7-9.6, total shoot DW per pot was less than 1.3 g, while for pots with SPW pH between 9.7 and 10.6, shoot biomass was about 0.2 g DW.

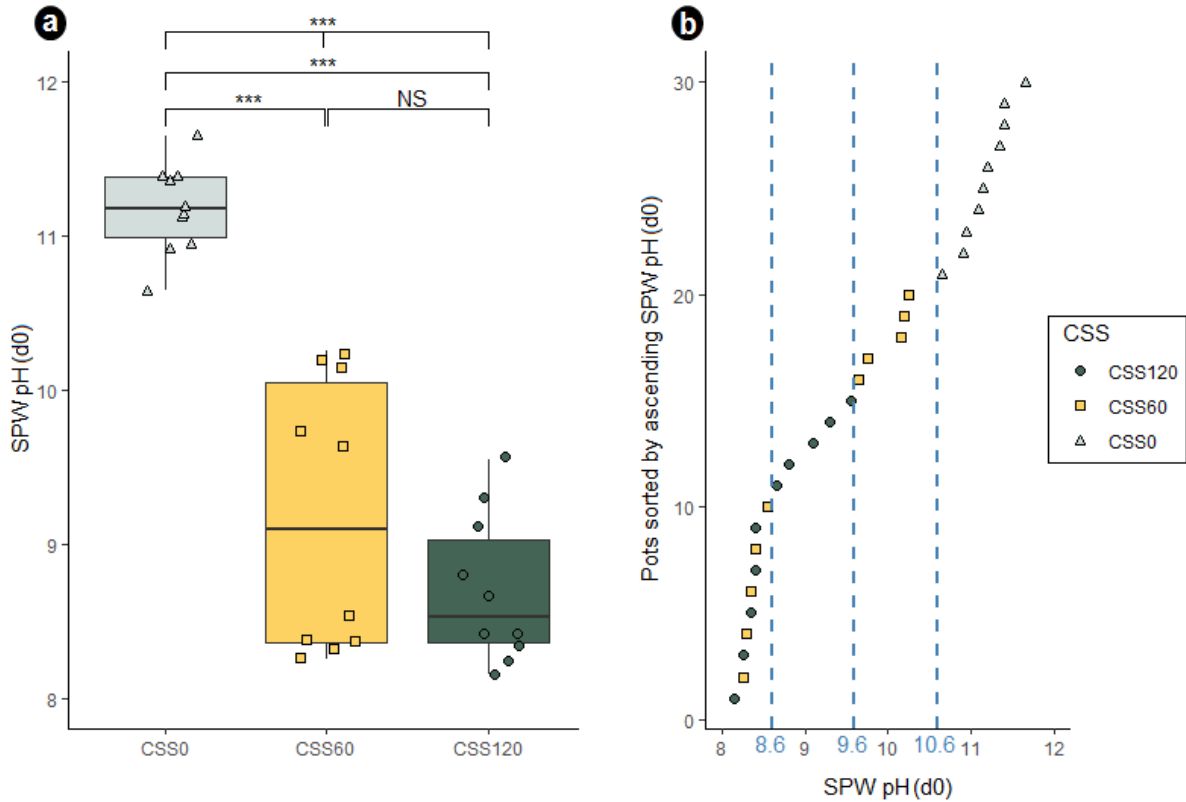
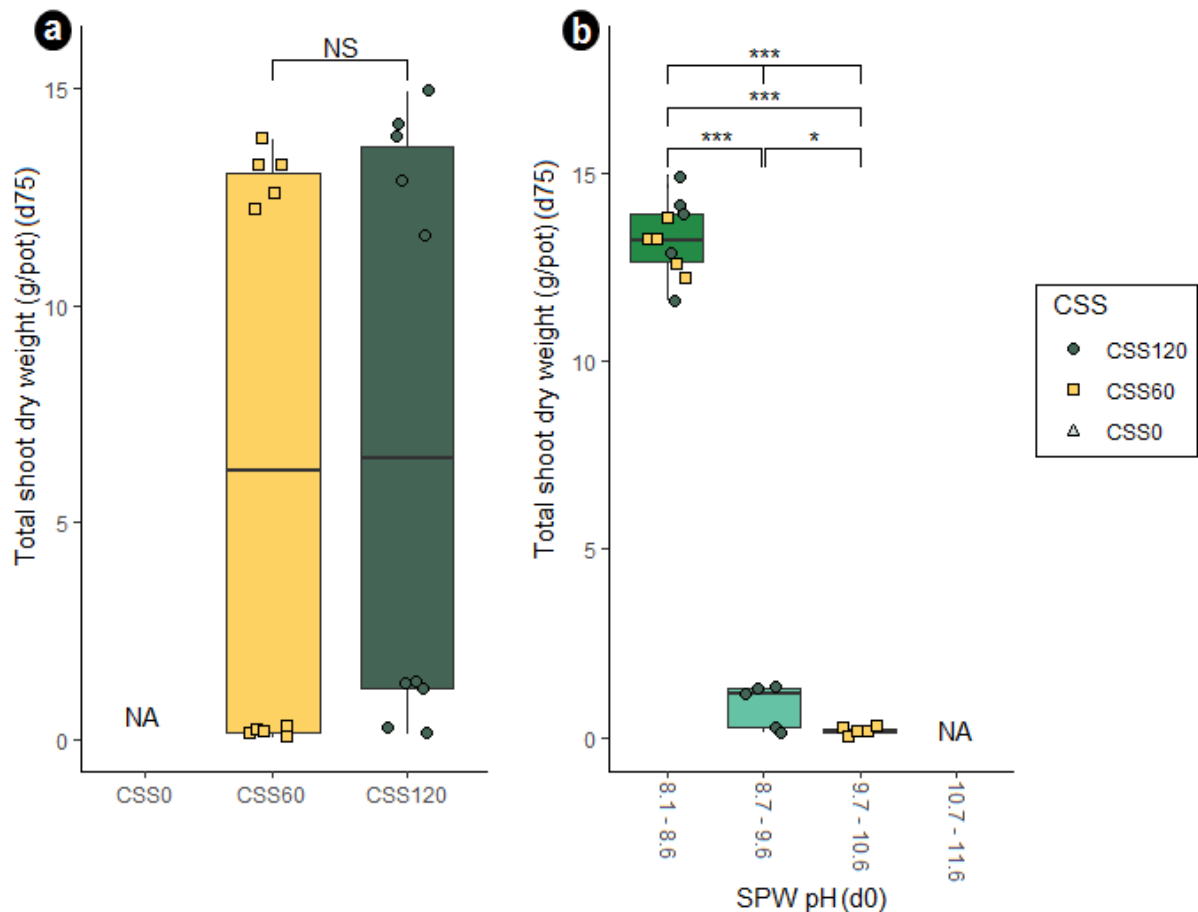


Figure 1: Distribution of soil pore water (SPW) pH of bare slag, and of slag amended with composted sewage sludge (CSS), at the day of sowing (d0). (a) Effect of CSS addition on SPW pH (CSS0: bare slag, n=10; CSS60: slag with 60 T/ha CSS, n=10; CSS120: slag with 120 T/ha CSS, n=10), (b) pH values of the experimental pots (n=30), sorted by an ascending order.

When shoot dry weight was computed for each individual species, the same trend was noticed (data not shown). For *B. erectus*, *F. arundinacea* and *M. sativa*, growth was observed from pH 8.1 to 10.6, but was significantly reduced above pH 8.6, while *M. officinalis* was severely affected within the range 8.7-9.6, and did not grow at all when SPW's pH was above 9.6. For *A. millefolium*, growth was very few and was observed in only two pots whose pH was below 8.6.





**Figure 2:** Total shoot dry weight (g/pot) of a plant assemblage made of 5 species (*Achillea millefolium*, *Bromus erectus*, *Festuca arundinacea*, *Melilotus officinalis* and *Medicago sativa*), sown on bare slag and on slag amended with composted sewage sludge (CSS), harvested after 75 days of culture. (a) effect of CSS amount on biomass production (CSS0: bare slag, n=10; CSS60: slag with 60 T/ha CSS, n=10; CSS120: slag with 120 T/ha CSS, n=10), (b) effect of SPW pH at the day of sowing (d0), on biomass production.

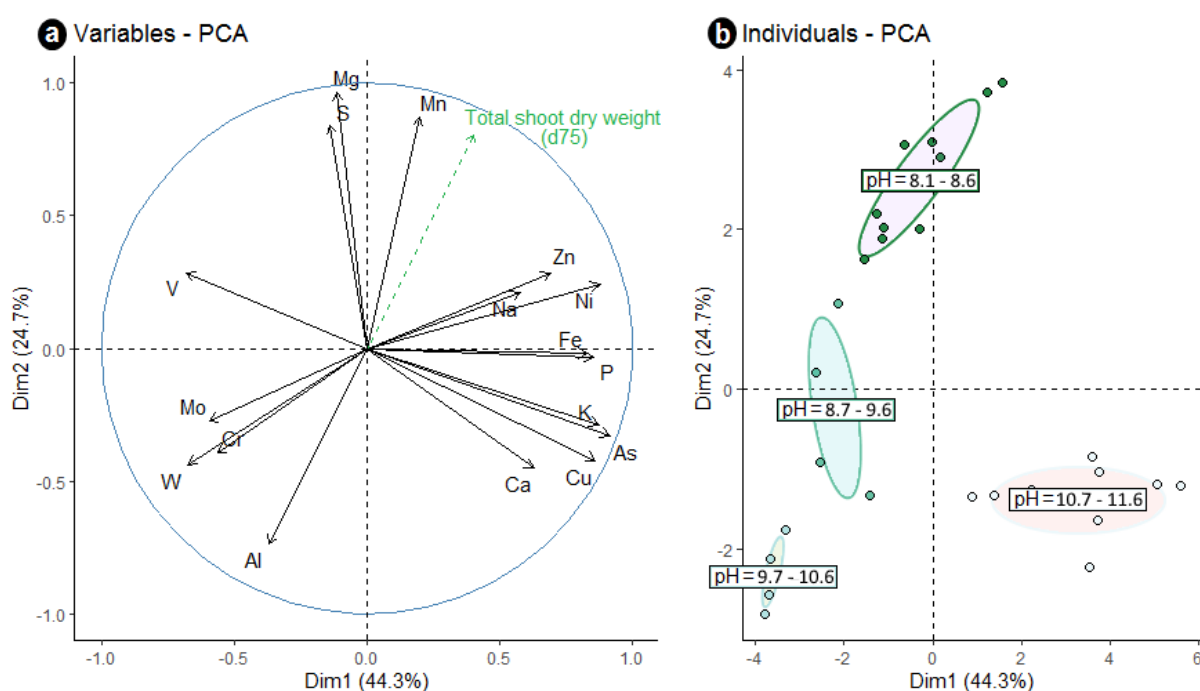
### 3.3. Plant biomass is related to elemental composition of SPW

Possible links between pH, elemental composition of SPW and plant biomass were explored using correlation analyses.

As a preliminary exploratory approach, a PCA was performed on elemental composition of SPW at the time of sowing (Fig. 3). The first two principal components caught 69% of data variance; the loading plot for the two first axis is given in Fig. 3a. The first PC axis accounted for 44.3% of total variance of the data set; its major loadings were As, Cu, Fe, K, Ni, and P and, negatively-correlated to the former, Cr, Mo, V and W. The second axis explained 24.7%

of variance and was mainly driven by S, Mg and Mn on one hand, and Al, on the other hand. It is noteworthy that total shoot biomass (added on the loading plot as a supplementary variable), was anticorrelated to soluble Al, Cr, Mo and W in SPW (Fig. 3a). The scatter plot of PC scores distinctly separated experimental pots when grouped according to SPW's pH measured at d-0 (Fig. 3b). Pots with pH below 8.6 were distinctly separated from those within the range 8.7-9.6 and 9.7-10.6 on the PC2 (*i.e.* they had overall higher soluble contents in Mg, Mn and S, and lower contents in soluble Al, Cr and W).

To go a step further in this analysis, Spearman correlations between shoot dry weight production and element concentrations in the SPW were calculated for each species (except for *A. millefolium*, whose number was too small). Results showed (Fig. 4) that soluble contents in Mg, Mn, and P, were strongly and positively correlated with biomass production for the four studied species; likewise, Ni, S and Zn were positively correlated to plant biomass for three out the four studied species. Conversely, SPW contents in Al, Cr, Mo and W were strongly and negatively correlated to plant growth for all species, but *Medicago sativa*.



**Figure 3:** Principal component analysis (PCA) of elemental composition of soil pore water (SPW) of the 30 experimental pots at day 0. (a) Correlation circle of the 17 measured elements (Total Shoot dry weight at d75 was added as a supplementary variable), (b) scatter plot of PC scores of each pot, grouped as a function of SPW pH.

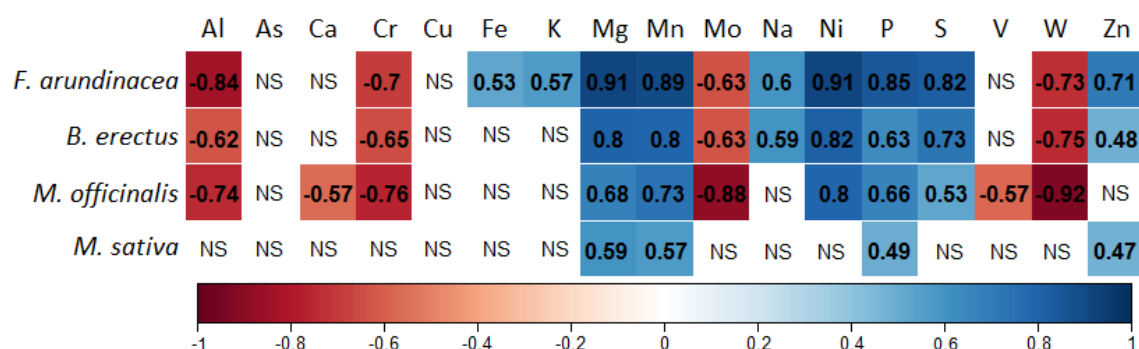
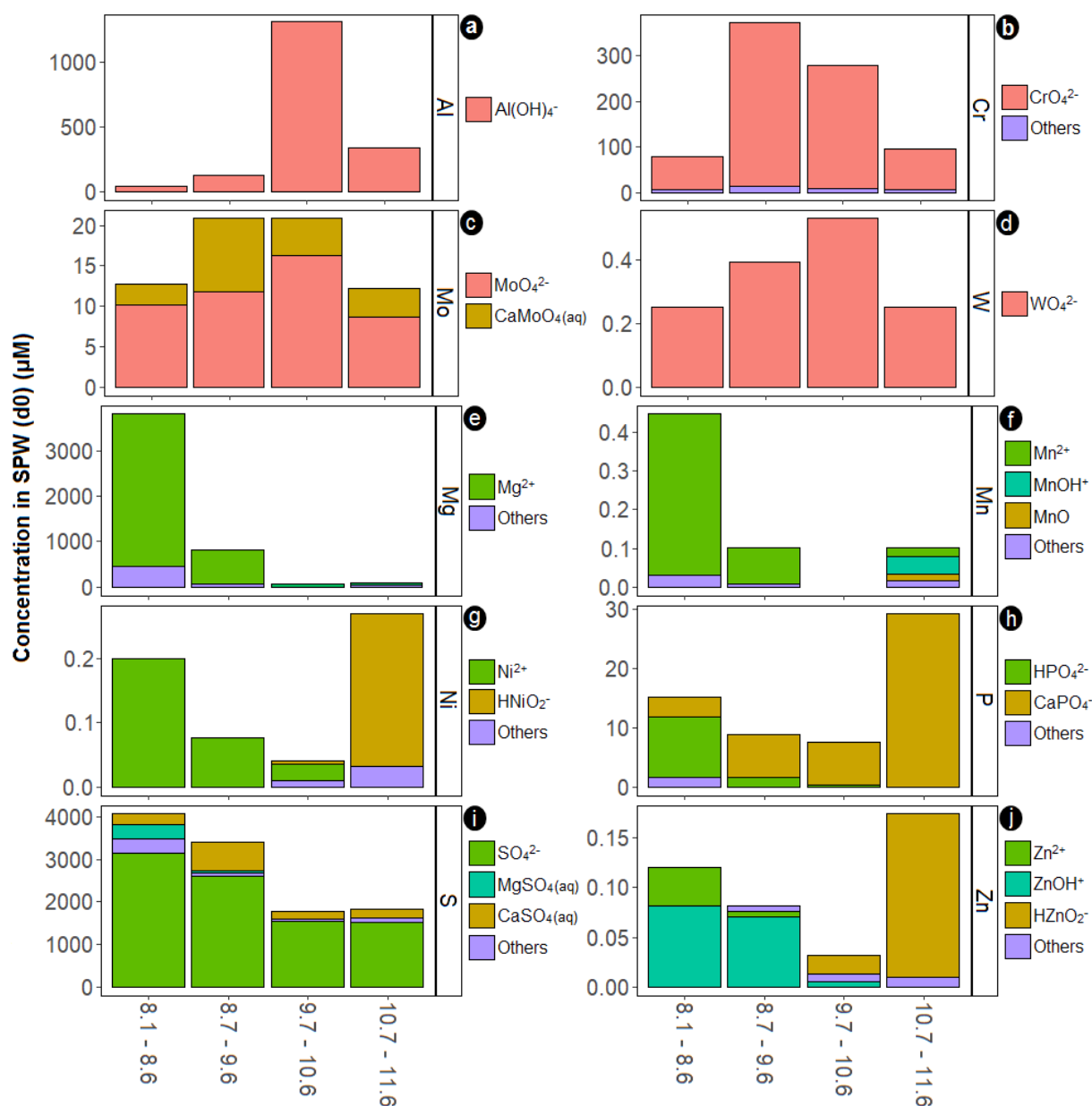


Figure 4: Spearman correlation coefficients between shoot dry weights of individual plant species (measured after 75 day of culture), and element contents in soil pore water at the day of sowing.

### 3.4. Element speciation in SPW depends on pH

More than their total concentration in SPW, the phytoavailability of soluble elements, and thus their impact on plant development, depends on their chemical speciation. Therefore, we conducted a geochemical modelling of SPW composition within the studied pH ranges, to characterize the dominant chemical species of elements which were either negatively or positively correlated with plant growth, *i.e.* Al, Cr, Mo and W, on one hand and Mg, Mn, Ni, P, S and Zn on the other hand. Results are given in Fig. 5.

For Al, Cr and W (Fig. 5a, b and d), dominant species in SPW within the studied pH ranges were almost exclusively the oxyanions aluminate ( $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ ), chromate ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) and tungstate ( $\text{WO}_4^{2-}$ ). However, their total content in SPW was dependent on the pH range and was minimal when pH was below 8.6 or above 10.7. This was particularly noticeable for  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ , whose concentration was about 30-fold lower within the pH range 8.1-8.6, as compared to the range 9.7-10.6 (Fig. 5a). Likewise, SPW contents in  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Fig. 5b) and  $\text{WO}_4^{2-}$  (Fig. 5d) were about 3-fold lower at pH 8.1-8.6, as compared to the ranges 8.7-9.6 or 9.7-10.6, respectively. Concerning Mo (Fig. 5c), two major chemical species were evidenced: the molybdate anions ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) and aqueous calcium molybdate ( $\text{CaMoO}_4(\text{aq})$ ); the level in  $\text{MoO}_4^{2-}$  was almost constant within the studied pH range, but the level in  $\text{CaMoO}_4(\text{aq})$  slightly decreased when pH was below 8.6.



**Figure 5:** Distribution of soluble chemical species as a function of soil pore water (SPW) pH at the day of sowing (d0). (a to d) elements negatively correlated to plant growth; (e to j) elements positively correlated to plant growth.

Chemical species grouped as "others" are those species that together accounted for less than 15% of total chemical species.

Mg (Fig. 5e) mostly occurred as free magnesium cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ); however total  $\text{Mg}^{2+}$  amount was much higher when SPW pH was below 8.6: within the ranges 8.7-9.6 and 9.7-10.6, its total level was respectively 4.6- and 111-fold lower than within the range 8.1-8.6.

For Mn (Fig. 5f), three chemical species were identified: the free manganese cations ( $\text{Mn}^{2+}$ ), and the manganese oxyde ( $\text{MnO}$ ) and the monohydroxy manganese (II) cations ( $\text{Mn}(\text{OH})^+$ ). Total levels and respective concentrations of these Mn species were closely dependent on SPW pH.  $\text{Mn}^{2+}$  was the dominant chemical species within the pH range 8.1-8.6 where it accounted for 92% of total soluble Mn; at the opposite,  $\text{MnO}/\text{Mn}(\text{OH})^+$  were only present within the pH range 10.7-11.6, *i.e.* in non-amended slag. Within the pH range 9.7-10.6, no soluble Mn was detected.

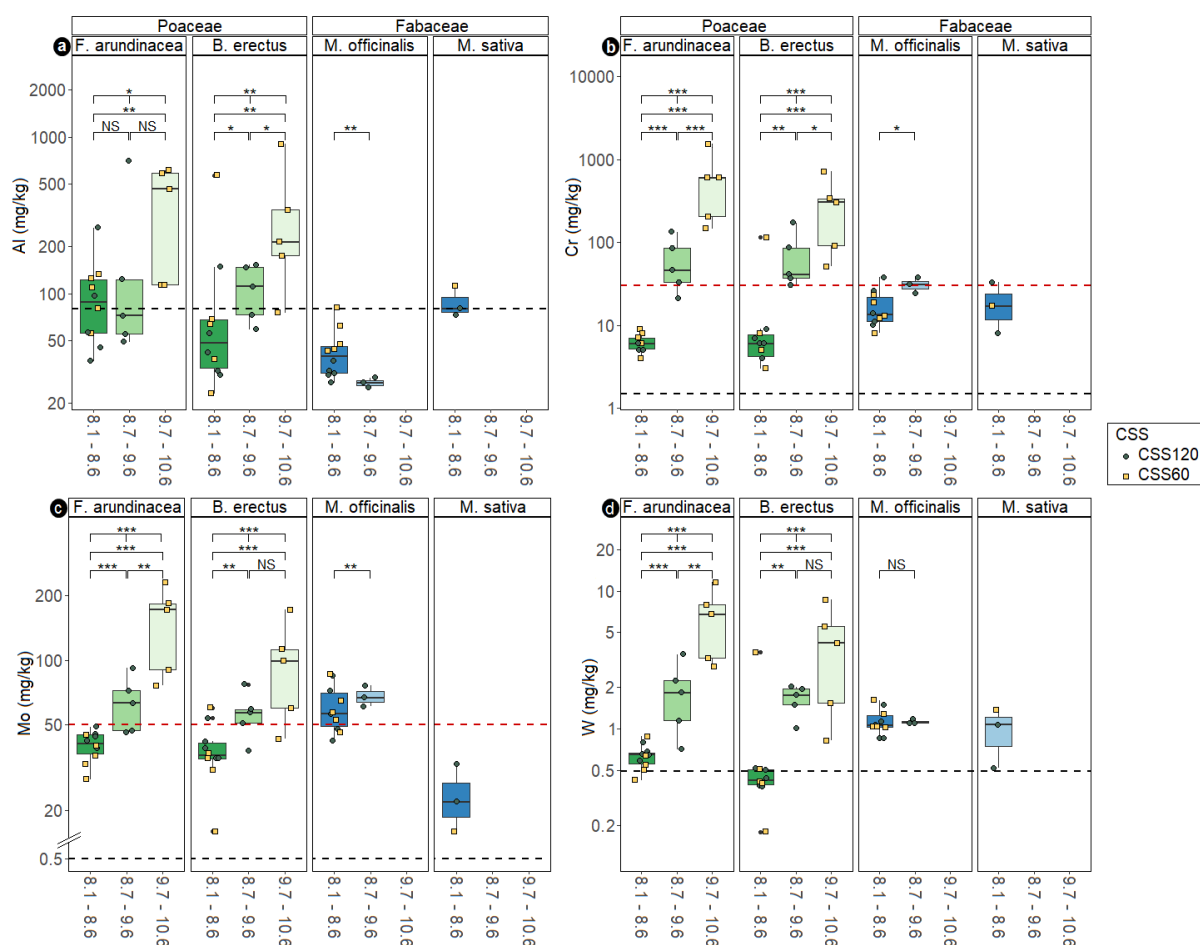
For Ni (Fig. 5g), two major species were evidenced: the nickel cation ( $\text{Ni}^{2+}$ ) and the hydroxy(oxo)nickel anion ( $\text{HNiO}_2^-$ ). The latter was almost exclusively found in non-amended slag within the pH range 10.7-11.6, where it accounted for 88% of total soluble Ni. By contrast,  $\text{Ni}^{2+}$  was the dominant species in CSS amended slag and its content in SPW clearly increased when pH decreased.

For P (Fig. 5h), two main chemical species were present within the studied pH range: the hydrogen phosphate anion ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) and the calcium orthophosphate anion ( $\text{CaPO}_4^-$ ). Within the pH range 10.7-11.6, soluble P was quite high (about 30  $\mu\text{M}$ ), but was exclusively as  $\text{CaPO}_4^-$ . Decreasing pH led to a sharp decrease in  $\text{CaPO}_4^-$  and a concomitant increase in  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Thus, within the pH range 8.1-8.6, the main P species was  $\text{HPO}_4^{2-}$ , which represented close to 70% of total soluble P, and reached about 10  $\mu\text{M}$ .

S (Fig. 5i) mainly occurred as three chemical species: the sulfate anion ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), aqueous magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4(\text{aq})$ ) and aqueous calcium sulfate ( $\text{CaSO}_4(\text{aq})$ ). However, within all studied pH ranges the dominant species was  $\text{SO}_4^{2-}$ , which represented between 70 and 80% of total soluble S. The concentration of  $\text{SO}_4^{2-}$  in SPW increased when pH decreased, and reached about 3 mM within the pH range 8.1-8.6.

Lastly, soluble Zn (Fig. 5j) appeared as three main chemical species: the free zinc cation ( $\text{Zn}^{2+}$ ), the zinc hydroxyde cation ( $\text{ZnOH}^+$ ), and the hydrogen zincate anion ( $\text{HZnO}_2^-$ ). The  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{ZnOH}^+$  cations were virtually absent at pH higher than 9.7, but their content in SPW increased when pH decreased to the range 8.1-8.6, reaching about 0.04  $\mu\text{M}$  and 0.08  $\mu\text{M}$ , respectively. Conversely, the  $\text{HZnO}_2^-$  anion was quite high within the pH range 10.7-11.6 (0.16  $\mu\text{M}$ ), but sharply decreased with pH.

### 3.5. Plant nutritional status depends on SPW pH

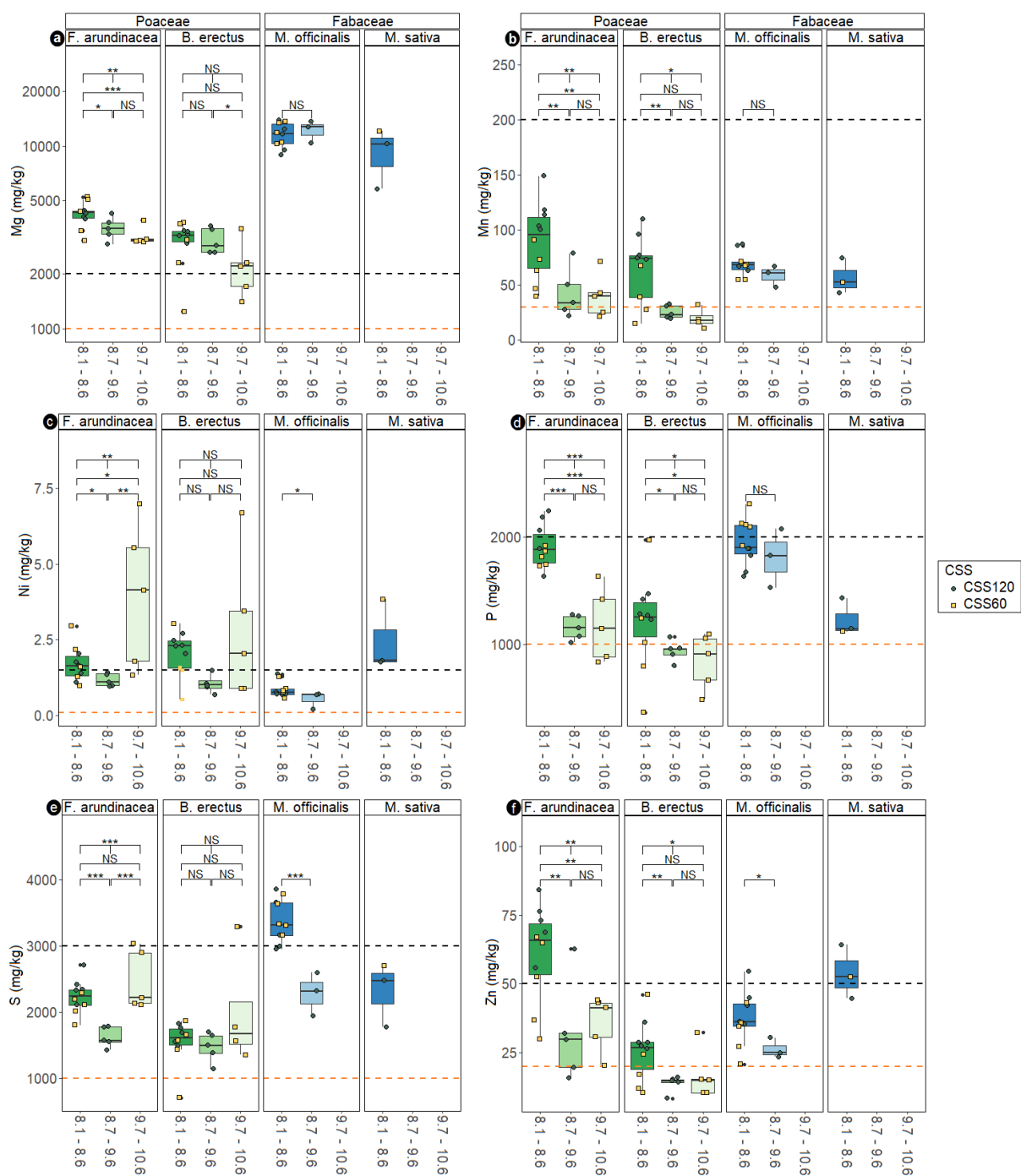


**Figure 6:** Leaf contents (after 75 days of culture) in elements negatively correlated to plant growth on steel slag amended with composted sewage sludge, as a function of soil pore water pH at the day of sowing.

Black lines indicate usual or sufficient concentrations in plants leaves while red lines are excessive or toxic levels.

Leaf ionome of the four plant species that grew in CSS-amended slag was studied in order to evaluating the influence of SPW's pH on the accumulation of toxic or essential elements. For comparison purposes, reference values for "usual" levels, "excessive or toxic" levels, and "deficient" levels for leaf element concentrations were taken from the literature, when available (Market, 1992; Kabata-Pendias, 2011; Marshner, 2012).

Fig. 6 shows foliar concentrations of elements whose SPW contents were negatively correlated to plant growth (*i.e.* Al, Cr, Mo and W).



**Figure 7:** Leaf contents (after 75 days of culture) in elements positively correlated to plant growth on steel slag amended with composted sewage sludge, as a function of soil pore water pH at the day of sowing.

Black lines indicate usual or sufficient concentrations in plants leaves while orange lines are deficiency levels.

Median Al concentration in leaves of the four studied species (Fig. 6a) was very close or slightly lower than "usual" concentration in plants ( $\approx 80$  mg/kg), when pH was in the ranges 8.1-8.6 and 8.7-9.6. However, for *F. arundinacea* and *B. erectus* leaf Al significantly increased (up to 500 mg/kg) when pH was in the range 9.7-10.6 (no data was available for the *M. officinalis* and *M. sativa* within this pH range).

Cr in leaves (Fig. 6b) significantly increased with SPW's pH. Within the range 8.1-8.6, leaf Cr was 4- to 11-fold higher than "usual" content in plants ( $\approx 1.5$  mg/kg), but remained lower than "excessive or toxic" levels ( $\approx 30$  mg/kg). By contrast, within the pH ranges 8.7-9.6 and 9.7-10.6, Cr in leaves sharply increased, reaching up to 20-times the threshold value for "excessive or toxic" concentration within the highest pH range.

In the same way as Cr, leaf content in Mo (Fig. 6c) and W (Fig. 6d) significantly increased with SPW's pH. Within the pH range 8.1-8.6, leaf Mo was about 50- to 100-fold higher than usual level ( $\approx 0.5$  mg/kg) and was just below or slightly higher than "excessive or toxic" level ( $\approx 50$  mg/kg). At higher pH, Mo in leaves noticeably increased, reaching more than 3 times the threshold for "excessive or toxic" concentration. For W, leaf content was close to usual level ( $\approx 0.5$  mg/kg) when SPW pH was within the range 8.1-8.6, and rose up to approx. 15-times the usual level within the range 9.7-10.6. Note that for W no toxicity threshold was found in the literature.

Fig. 7 shows foliar concentrations of elements whose SPW contents were positively correlated to plant growth (*i.e.* Mg, Mn, Ni, P, S and Zn).

In the four studied species, median content in leaf Mg (Fig. 7a) was higher than usual content in plants ( $\approx 2,000$  mg/kg), and slightly decreased when pH increased. Note that leaf Mg was lower in the two *Poaceae* species (*F. arundinacea* and *B. erectus*), than in the two *Fabaceae* species (*M. officinalis* and *M. sativa*), ranging from 2,200 to 4,300 mg/kg and from 10,000 to 12,000 mg/kg, respectively.

Mn in leaves (Fig. 7b) was below usual content in plants ( $\approx 200$  mg/kg), but remained higher or very close to deficiency threshold ( $\approx 20$  mg/kg). According to the species, leaf Mn content was comprised between 50 and 100 mg/kg, when SPW's pH was in the range 8.1-8.6. Increasing pH of SPW from 8.1-8.6 to 8.7-9.6, significantly decreased leaf Mn content, at least in the two *Poaceae* species.



Leaf Ni (Fig. 7c) was close to usual level in plants ( $\approx 1.5$  mg/kg) and varied between 0.7 and 4.1 mg/kg, according to the species and pH range. Although *F. arundinacea* accumulated significantly higher Ni when SPW's pH was in the range 9.7-10.6, in any case leaf Ni remained far below toxicity threshold ( $\approx 50$  mg/kg) and above deficiency level ( $\approx 0.1$  mg/kg). P in leaves (Fig. 7d) varied according to species and pH range. When SPW's pH was within 8.1-8.6, leaf P of *F. arundinacea* and *M. officinalis* was close to usual value in plants ( $\approx 2,000$  mg/kg); by contrast, within the same pH range leaf P was close to deficiency threshold ( $\approx 1,000$  mg/kg) for *B. erectus* and *M. sativa*. When SPW's pH was higher than 8.6, leaf P significantly decreased to values close or below deficiency level.

For S content in leaves (Fig. 7e), no clear relationship between pH and/or species was observed. For instance, in *B. erectus* leaf S was almost the same within the different pH ranges, while for *M. officinalis* it significantly decreased when pH increased. However, in any case, leaf S was above deficiency threshold.

Lastly, Zn in leaves (Fig. 7f) varied according to species and pH. For *F. arundinacea* and *M. sativa* grown within the pH range 8.1-8.6, leaf Zn reached respectively 66 and 53 mg/kg, that was very close to usual level in plants ( $\approx 50$  mg/kg). In the same pH range, leaf Zn in *B. erectus* and *M. officinalis* was respectively 27 and 36 mg/kg; this was slightly lower than usual level, but still higher than deficiency threshold ( $\approx 15$  mg/kg). In every case, plants accumulated significantly lower Zn when SPW's pH was  $> 8.6$ .

## 4. Discussion

### 4.1. Seed germination onto unamended slag is hampered by high pH

The results obtained in this study confirm (Bouchardon *et al.*, 2014; Oustrière *et al.*, 2016) that plants cannot grow on bare metallurgical slag. Indeed, germination percentages for all five studied species were nil when sown onto unamended slag. It is worth to note that even at the studied slag dump, which has yet been derelict since several years, no plant was observed. In fact, germination (*i.e.* early events of plantlet development, beginning with seed imbibition, and ending with radicle emergence) is very sensitive to environmental conditions, such as

drought, temperature, oxygen and light, as well as other abiotic factors, such as high pHs, high salinity (Llanes *et al.*, 2016) and soil content in organic and inorganic pollutants (You *et al.*, 2019).

The studied metallurgical slag had a high content in potentially toxic metals and a high pH, that could both affect seed germination. However, our data do not bring evidence that the high metal content in unamended slag was the primary cause of germination failure. Indeed, albeit SPW of unamended slag contained relatively high content in soluble Al, Cr, Mo and W, these amounts (Fig. 5) were not higher, or were even lower, than those measured in CSS-amended slag where seed germination and plantlet development was yet observed. In fact, the inhibitory effect of metal elements on seed germination has been seldom studied to date, and a great variability in responses has been reported according to the element, its concentration, the plant species and even the cultivar chosen (Marquez-Garcia *et al.*, 2013; Mot *et al.*, 2019). However, it is generally admitted that metal toxicity mostly affects root development and seedling growth during plantlet establishment, rather than germination *sensu stricto* (Li *et al.*, 2005; Kranner and Colville, 2011).

By contrast, the extreme slag's pH (>11), is a severe constraint germinating seeds have to face. Although mechanisms involved in the inhibition of seed germination in highly alkaline soils are still debated, it is likely (Ma *et al.*, 2015) that the key-inhibiting factor for germination at high pH is the alkaline stress induced by high concentration in bicarbonate and/or carbonate ions. This triggers an imbalance of the water status of the germinating seed, leading to a severe physiological drought (Liu *et al.*, 2010) at a stage where water uptake is highly critical for successful germination. Such a water deficit dramatically increases in substrates with very low water retention capacity, as metallurgical slags, and is probably one of the main factors causing germination to fail on bare slag.

#### *4.2. Decreasing pH below 8.6 is a key-factor for plant growth and development*

In this study we used CSS as an organic amendment to decrease slag's pH. Although this allowed seeds to germinate, plant growth was highly heterogeneous between experimental pots, and this was clearly related to the SPW pH of each pot. Indeed, regardless of the CSS level, when pH equilibrated to values below 8.6, all sown species, but *A. millefolium*,

developed and produced high biomass; conversely, when pH was above 8.6, seeds germinated but plant growth was severely affected (Fig. 2). Thus we concluded that the main limiting factor for plant development onto CSS-amended slag was the SPW pH value, which should be mandatory less than 8.6 for an adequate growth.

It is well known that high pH affects root activity and disrupts water uptake, leading to plant growth reduction (Zhang *et al.*, 2013; Zhang and Zwiazek, 2016a and b). These perturbations of root hydraulic properties and plant water relations are primarily due to an inhibition of root aquaporins (Javot and Maurel, 2002; Gambetta *et al.*, 2017). However, aquaporins are known to be sensitive to both pH and mineral nutrient availability (Wang *et al.*, 2016; Kapilan *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2020). Consequently, it is not clear whether plant growth reduction and associated physiological perturbations at high pH are directly due to pH toxicity or to a pH-induced imbalance of nutrients and toxic metals in the soil pore water. This topic has been recently addressed by Zhang and Zwiazek (2016a), who concluded that "the impaired growth and physiological performances at high pH are more likely caused by nutrient deficiencies than by direct or indirect pH-induced toxicity". In line with this result, the PCA performed on SPW compositions revealed that elements were indeed differently partitioned according to pH (Fig. 3). Overall, plant biomass was negatively correlated with SPW concentrations in Al, Cr, Mo and W, while it was positively correlated with soluble Mg, Mn, Ni, P, S and Zn. This suggested that plant growth and development on CSS-amended slag could be impaired due to an excess of potentially toxic elements as well as a lack in essential nutrients, both being pH-dependent.

#### *4.3 Decreasing pH below 8.6 alleviates chromium toxicity and improves manganese, phosphorus and zinc phytoavailability*

Among those elements that could negatively affect plant growth on slag, Al showed the highest level in SPW (Fig. 5a), varying from ca. 40  $\mu\text{M}$  up to 1300  $\mu\text{M}$ , according to the pH range. Speciation analyses showed that, within the whole pH range considered (*i.e.* 8.6-11.6), soluble Al was exclusively aluminate anions  $[\text{Al}(\text{OH})_4^-]$ . Plant analyses (Fig. 6a) revealed that leaf Al concentrations were about 4- to 5-fold higher than usual levels when SPW pH was within the range 9.7-10.6; that is, a pH range where plant growth was severely affected. However, when pH was in the range 8.7-9.6, Al in leaves was very close to usual levels, but

plant growth was also very weak. This suggests that high Al content in leaves was not the primary cause for plant growth reduction.

The second potentially toxic element which was in high level in SPW was Cr; its concentration was approx. 80  $\mu\text{M}$  when pH was in the range 8.1-8.6 and rose up to ca. 300  $\mu\text{M}$  when pH was within the range 8.7-10.6 (Fig. 5b). Chromium in SPW was almost exclusively present as chromate ion ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ), the Cr most labile and toxic form (Shahid *et al.*, 2017; Sinha *et al.*, 2018). In fact, due to its high positive redox potential, hexavalent chromium triggers oxidative stress inducing deleterious effects on plant cells, such as DNA breakages, lipid peroxidation and enzyme inhibition (Signh *et al.*, 2013; Shahid *et al.*, 2017). Plants exposed to Cr toxicity exhibit a lower germination rate, as well as root growth inhibition and reduced shoot development (Tiwari *et al.*, 2009). Although Cr toxicity or tolerance can vary between species, its usual level in leaves is about 1.5 mg/kg DW, and toxicity symptoms can occur at levels in excess of 30 mg/kg DW (Market, 1992; Kabata Pendias, 2011; Marshner, 2012). Analysis of plants grown on CSS-amended slags showed that, whatever the species studied, leaf Cr was higher than usual levels in plants, and sharply increased with SPW pH (Fig. 6b). However, when SPW pH was below 8.6, leaf Cr remained below toxic levels. By contrast, when pH was above 8.6, leaf Cr significantly exceeded toxicity level. Consequently, there was a clear relationship between the pH of SPW, the concentration in soluble chromate ion, the chromium level in plant leaves, and, finally, plant biomass production. This strongly suggests that the pH-dependent decrease in chromate level in SPW was a key factor for plant growth and development on slag.

Mo occurred in SPW as two main species:  $\text{MoO}_4^{2-}$  and  $\text{CaMoO}_4(\text{aq})$ , only the former being available to plants (Barker and Pilbeam, 2015). The level in molybdate anion in SPW slightly increased when pH increased (Fig. 5c). As a result, leaf Mo content increased with pH (Fig. 6c) and varied between ca. 30 to 180 mg/kg, according to the plant species and the pH range considered. Although leaf Mo levels above 50 mg/kg are considered as "excessive", when compared to the usual content of 0.5 mg/kg (Market, 1992; Kabata Pendias, 2011; Marshner, 2012), Mo is actually poorly toxic for plants and numerous species can accumulate Mo levels in leaves as high as 500 mg/kg and up to 2000 mg/kg, without any deleterious effect on growth (Barker and Pilbeam, 2015). Consequently, in our experimental conditions, it is very unlikely that Mo toxicity was a limiting factor for plant development.

The fourth element negatively correlated with plant growth was W. In CSS-amended slag, W was exclusively present as tungstate anion and its concentration in SPW slightly increased with pH (Fig. 5d). Likewise, leaf W content increased with pH (Fig. 6d), ranging from ca. 0.5 to 8 mg/kg, according to the plant species and pH value. Usual W concentration in plants leaves is about 0.5 mg/kg (Market, 1992; Kabata Pendias, 2011; Marshner, 2012), but toxic concentrations remained to be defined. However, studies performed on plants grown on naturally W rich soils (Quin and Brooks, 1974), or abandoned mining area (Pratas *et al.*, 2005; Pé-Leve Santos *et al.*, 2013), commonly reported W concentrations in leaves higher than 10 mg/kg, without toxicity symptoms. Consequently, in our experimental conditions, it is likely that W levels did not reach toxicity threshold and was not a key-factor limiting plant development on slag.

Among elements that positively correlated with plant growth were three micronutrients (Mn, Ni and Zn) and three macronutrients (Mg, P and S).

Mn content and its chemical speciation in SPW was highly pH-dependent (Fig. 5f). At pH > 8.6, Mn in SPW was very low (< 0.1  $\mu\text{M}$ ); as a result, leaf Mn (Fig. 7b) was close to deficiency level. When pH was < 8.6, soluble Mn increased; thus, Mn in leaves increased significantly, although it remained below usual levels in plants. Due to its redox properties, Mn acts as an enzyme activator or cofactor for many enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (*e.g.* peroxidase and catalase); it is thus closely involved in the prevention of cell damages caused by free radicals (Frausto da Silva and Williams, 2001). Mn is also part of photosystem II, where it is necessary for the photolysis of water and the production of dioxygen during photosynthesis. Consequently, when slag's pH is above 8.6, Mn-deficiency could alter the photosynthetic efficiency as well as the mechanisms involved in the detoxification of reactive oxygen species. This, coupled with the oxidative stress induced by chromate ions, could be a key-factor limiting plant development on slag at pH higher than 8.6.

Ni in SPW was mostly as the phytoavailable form  $\text{Ni}^{2+}$  and markedly decreased when pH increased (Fig. 5g). However, within the pH range 8.1 - 10.6, leaf Ni (Fig. 7c) remained close to usual value and was not below deficiency threshold. This suggests that Ni was not an element of concern for plant growth restriction on slag.

Soluble Zn in CSS amended pots was very low ( $< 0.15 \mu\text{M}$ ) and significantly decreased when pH increased (Fig. 5j). Accordingly, leaf Zn (Fig. 7f) varied with SPW pH and, for pH higher than 8.6, it was close or below deficiency level. By contrast, at  $\text{pH} < 8.6$ , leaf Zn was close to usual level, except for *B. erectus* where it remained very low. Owing that more than 1200 proteins contain or act with Zn, a deficiency in this element may obviously affect numerous metabolic pathways. However, like Mn, Zn is involved both in photosynthesis, as a cofactor of carbonic anhydrase (Escudero-Almanza *et al.*, 2012), and in the detoxification of reactive oxygen species, as part of the Cu-Zn superoxide dismutase (Obata *et al.*, 1999). Thus, at pH above 8.6, Zn deficiency could be a key factor, strengthening the effect of Mn deficiency in plant growth prevention.

Mg in SPW was almost exclusively as the plant-available  $\text{Mg}^{2+}$  species and sharply decreased when pH increased (Fig. 5e). However, within the whole pH range of CSS-amended slag, leaf Mg was above usual levels (Fig. 7a). Thus, Mg availability and accumulation was not a limiting factor for plant growth onto slag.

P in SPW of CSS amended slag was partitioned between two main chemical species (Fig. 5h):  $\text{HPO}_4^{2-}$ , which is easily available to plants, and  $\text{CaPO}_4^-$ , which is not available for plant uptake (Marshner, 2012). The former was the major form at  $\text{pH} < 8.6$ , while the latter was the major form at  $\text{pH} > 8.6$ . Accordingly, except for *M. officinalis*, plants grown at  $\text{pH} > 8.6$  had significantly lower leaf P content (approx.  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) than those grown at  $\text{pH} < 8.6$  (approx.  $2000 \text{ mg/kg}$ ) (Fig. 7d). It is generally admitted that the P requirement for optimal growth lies between 2000 and  $5000 \text{ mg/kg}$  (Barker and Pilbeam, 2015), while deficiency level is below  $1000 \text{ mg/kg}$ . Thus, plants grown on CSS amended slag were very close to deficiency threshold when pH was  $> 8.6$ , and decreasing pH below 8.6 partly improved their P nutritional status.

Lastly, S in SPW was mainly as the  $\text{SO}_4^{2-}$  phytoavailable form and increased when pH decreased (Fig. 5i). Although S concentrations in plant tissues depends on many factors, and especially the species considered and its growth stage (Withers, 1995; Hitsuda *et al.*, 2005) it is admitted that usual levels in leaves are approx.  $3000 \text{ mg/kg}$  and deficiency occurs at less than  $1000 \text{ mg/kg}$ . Whatever the pH of SPW, plants grown on amended slag had leaf S level between 1500 and  $3200 \text{ mg/kg}$ , meaning that plants were not subject to S-deficiency (Fig. 7e).

## 5. Conclusions

The results of this study showed that pH was indeed a key-factor for the success or failure of aided-phytostabilization at steel slag dumps. When pH was above 8.6, plant growth and development were severely restricted. This was due to both Cr(VI) toxicity, inducing oxidative injuries, and to deficiencies in Mn, Zn and P, that are essential elements closely involved in antioxidative defenses and plant energetics. By contrast, decreasing pH below 8.6 triggered changes in the chemical speciation of most elements, leading to a decrease in phytoavailable Cr(VI) and to a concomitant increase in phytoavailable Mn, Zn and P. As a result, Cr(VI) mobility and toxicity were mitigated, while plant nutrient status was improved, allowing efficient growth. Consequently, when implementing an aided-phytostabilisation project at a steel slagheap scale, care should be taken to carefully monitor soil pH before seeding; this should allow predicting how vegetation cover will install and survive, and how Cr(VI) mobility and transfer would be mitigated.

## References

- AFNOR (2008).** Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. *International Standard ISO 17402:2008*.
- Agnello, A.C., Potysz, A., Fourdrin, C., Huguenot, D. and Chauhan, P.S. (2018).** Impact of pyrometallurgical slags on sunflower growth, metal accumulation and rhizosphere microbial communities. *Chemosphere*, 208:626-639.
- Alexander, M. (2000).** Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*, 34:4259-4265.
- Allison, J.D. (1991).** Geochemical assessment model for environmental systems: version 3.0, user's manual. *British Library, Document Supply Center*.
- Barker, A.V. and Pilbeam, D.J. (2015).** Handbook of Plant Nutrition – Second Edition. *CRC Press, Taylor and Francis Group*, 743 pp.
- Bayless, E. R. and Schulz, M. S. (2003).** Mineral precipitation and dissolution at two-slag-disposal sites in northwestern Indiana, USA. *Environmental Geology*, 45:252-261.
- Bouchardon J.L., Faure O., Lespagnol G., Moutte J., Guy B., Mimoun D., Graillot D., Paran F., Croze V., Athenol, J.D., Ferrando B., Boisson J., Perret S., Hitmi A., Verney P., Moussard Gauthier C., Ledoigt G., Goupil P., Sac C. and Mench M. (2014).** Physafimm: La phytostabilisation, méthodologie applicable aux friches industrielles, métallurgiques et minières. *Rapport final, convention ADEME n° 0872C0119, ADEME Ed.*, 158 pp.
- Escudero-Almanza<sup>1</sup>, D.J., Ojeda-Barrios, D.L., Hernandez-Rodriguez, O.A., Sanchez Chavez, E., Ruiz-Anchondo<sup>1</sup>, T. and Sida-Arreola<sup>1</sup>, J.P. (2012).** Carbonic anhydrase and zinc in plant physiology. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72 (1):141-146.
- Frausto da Silva, J. J. R. and Williams, R. J. P. (2001).** The Biological Chemistry of Elements, The Inorganic Chemistry of Life. Second Edition. *Oxford university Press, Oxford*, 561 pp.
- Gambetta G.A., Knipfer T., Fricke W., McElrone A.J. (2017).** Aquaporins and root water uptake. In: Chaumont F., Tyerman S. (eds), Plant Aquaporins. Signaling and Communication in Plants. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49395-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49395-4_6)
- Ge, Y, Murray, P. and Hendershot, W.H. (2000).** Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution*, 107(1):137-144.



- Gomes, H. I., Mayes, W. M., Rogerson, M., Stewart, D. I. and Burke I. T. (2016).** Alkaline residues and the environment: a review of impacts, management practices and opportunities. *Journal of Cleaner Production*, 122:3571-3582.
- Gomes, H. I., Mayes, W. M., Whitby, P. and Rogerson, M. (2019).** Constructed wetlands for steel slag leachate management: partitioning of arsenic, chromium, and vanadium in waters, sediments, and plants. *Journal of Environmental Management*, 243:30-38.
- Hitsuda, K., Yamada, M. and Klepker, D. (2005).** Sulfur requirement of eight crops at early stages of growth. *Agronomy Journal*, 97:155-159.
- Javot, H. and Maurel, C. (2002).** The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90:301-313.
- Johnson, J.W., Oelkers, E.H. and Helgeson, H.C. (1992).** SUPCRT92: A software package for calculating the standard molal thermodynamic properties of minerals, gases, aqueous species, and reactions from 1 to 5000 bars and 0 to 1000°C. *Computers and Geosciences*, 18(7):899-947.
- Kabata-Pendias, A. (2011).** Trace elements in soils and Plants – Fourth Edition. *CRC Press, Taylor and Francis Group Boca Raton, FL*, 505 pp.
- Kaplan, R. Vaziri, M. and Zwiazek, J.J. (2018).** Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research*, 51:4.
- Kidd, P., Mench, M., Alvarez-Lopez, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J. O., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J. and Puschenreiter, M. (2015).** Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *International of Phytoremediation*, 17:1005-1037.
- Kranner, I. and Colville, L. (2011).** Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 72:93-105.
- Lê, S., Josse, J. and Husson, F. (2008).** FactoMineR: A package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1):1–18.
- Li, W., Khan, M.A., Yamaguchi, S. and Kamiya, Y. (2005).** Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 46:45-50.
- Liu, J., Guo, W.Q. and Shi, D.C. (2010).** Seed germination, seedling survival, and physiological response of sunflowers under saline and alkaline conditions. *Photosynthetica*, 48(2):278-286.

- Llanes, A., Andrade, A., Masciarelli, O., Alemano, S. and Luna, V. (2016).** Drought and salinity alter endogenous hormonal profiles at the seed germination phase. *Seed Science Research*, 26:1-13.
- Lock, K. and Janssen, C.R. (2003).** Influence of aging on copper bioavailability in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:1162-1166.
- Luo, Y., Wu, Y., Xing, R., Yao, C, Shu, J. and Wu, Z. (2018).** Effects of plant litter decomposition on chemical and microbiological characteristics of artisanal zinc smelting slag using indigenous methods. *Journal of Geochemical Exploration*, 190:292-301.
- Luo, Y., Wu, Y., Shu, J. and Wu, Z. (2019).** Effect of particulate organic matter fractions on the distribution of heavy metals with aided phytostabilization at a zinc smelting waste slag site. *Environmental Pollution*, 253:330-341.
- Luo, Y., Wu, X., Sun, H. and Wu, Y. (2020).** Root-induced changes in aggregation characteristics and potentially toxic elements (PTEs) speciation in a revegetated artificial zinc smelting waste slag site. *Chemosphere*, 243:  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125414>
- Ma, H., Yang, H., Lü, X., Pan, Y., Wu, H., Liang, Z. and Ooi, M.K.J. (2015).** Does high pH give a reliable assessment of the effect of alkaline soil on seed germination? A case study with *Leymus chinensis* (Poaceae). *Plant and Soil*, 394:35-43.
- Markert, B. (1992).** Establishing of "reference plant" for inorganic characterization of different plant species by chemical fingerprint. *Water, Air, and Soil Pollution*, 64:533-538.
- Marquez-Gracia, B., Marquez, C., Sanjosé, I., Nieva, F.J.J., Rodriguez-Rubio, P. and Munoz-Rodriguez, A.F. (2013).** The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Marine Pollution Bulletin*, 70:119-124.
- Marschner, P. (2012).** Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants – Third Edition. *Academic Press, Elsevier*, 651 pp.
- Mayes, W. M., Younger, L. and Aumônier, J. (2008).** Hydrogeochemistry of alkaline steel slag leachates in the UK. *Water, Air, and Soil Pollution*, 195:35-50.
- Mendez, M. and Maier, R. (2008).** Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, 116:278-283.
- Mot, A., Madjar, R., Badulescu, L. and Mihalache, M. (2019).** The effects of heavy metals on seed germination and seedling growth of *Lactuca sativa* L. and *Spinacia oleracea* L. *Research Journal of Agricultural Science*, 51(3):124-132.

- Moutte, J. (2009).** Arxim, a library for thermodynamic modeling of fluid-rock systems. <https://www.emse.fr/~moutte/arxim/> (site visited July 2020).
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G. (2003).** Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54:655-670.
- Obata, H., Kawamura, S., Senoo, K. and Tanaka, A. (1999).** Changes in the level of protein and activity of Cu/Zn-superoxide dismutase in zinc deficient rice plant, *Oryza sativa* L. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45(4):891-896.
- Oustriere, N., Marchand, L., Bouchardon, J. L., Faure, O., Moutte, J. and Mench, M. (2016).** Aided phytostabilization of a trace element-contaminated technosol developed on steel mill wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 320:458-468.
- Pé-Leve Santos, S.C., Cruz, M.E., Barroso, A.M.E., Fonseca, C.P.S., Guerra, M., Carvalho, M.L. and Santos, J.P. (2013).** Elemental characterization of plants and soils in Panasqueira tungsten mining region. *Journal of Soils and Sediments*, 14 (4):778-784.
- Piatak, N. M., Parsons, M. B. and Seal, R. R. (2015).** Characteristics and environmental aspects of slag: a review. *Applied Geochemistry*, 57:236-266.
- Pratas, J., Prasad, M.N.V., Freitas, H. and Conde, L. (2005).** Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *Journal of Geochemical Exploration*, 85:99-107.
- Quin, B.F. and Brooks, R.R. (1974).** Tungsten concentrations in plants and soils as a mean of detecting scheelite-bearing ore-bodies in New Zealand. *Plant and Soil*, 41:177-188.
- R Core Team (2017).** R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramos da Silva, W., Vieira da Silva, F.B., Muniz Araujo, P.R. and Araujo do Nascimento, C.W. (2017).** Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144: 522-530.
- Remon, E., Bouchardon, J.L., Le Guedard, M., Bessoule, J.J., Conord, C. and Faure O. (2013).** Are plants useful as accumulation indicators of metal bioavailability? *Environmental Pollution*, 175:1-7.
- Roadcap, G. S., Walton, R. K. and Bethke, C. M. (2005).** Geochemistry of extremely alkaline (pH > 12) ground water in slag-fill aquifers. *Ground Water*, 43:806-816.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Buraue, P., Craven, A. and Harms, H. (2004).** Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental science and technology*, 38(12):228A – 231A.

- Shahid, M., Shashad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., Dumat, C. and Rashid, M. I. (2017).** Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*, 178:513-533.
- Singh, H. P., Priyanka, M. Kaur, S., Batish, D. R. and Kohli, R. K. (2013).** Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters*, 11:229-254.
- Singh, R.K., Deshmukh, R., Muthamilarasan, M., Rani, R. and Prasad, M. (2020).** Versatile roles of aquaporins in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149:178-189.
- Sinha, V., Pakshirajan, K. and Chaturvedi, R. (2018).** Chromium tolerance, bioaccumulation and localization in plants: An overview. *Journal of Environmental Management*, 206:715-730.
- Tiwari, K.K., Dwivedi, S., Singh, N.K. Rai, U.N. and Tripathi, R.D. (2009).** Chromium (VI) induced phytotoxicity and oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.): Biochemical changes and translocation of essential nutrients. *Journal of Environmental Biology*, 30:389-394.
- Tukey, J.W. (1977).** Exploratory data analysis. *Pearson, Ed.*, 712 pp.
- Vamerali, T., Bandiera, M. and Mosca, J. (2010).** Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8:1-17.
- Wang, L., Bin, J., Yuehua, H., Runqing, L. and Sun, W. (2017).** A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 184:594-600.
- Wang, M., Ding, L., Gao, L., Li, Y., Shen, Q. and Guo, S. (2016).** The interactions of aquaporins and mineral nutrients in higher plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 17:1229.
- Withers, P.J.A., Tytherleigh, A.R.J. and O'Donnell, F.M. (1995).** Effect of sulphur fertilizers on the grain yield and sulphur content of cereals. *The Journal of Agricultural Science*, 125:317-324.
- You, R., Dominguez, C., Matamoros, V., Bayona, J.M. and Diez, S. (2019).** Chemical characterization and phytotoxicity assessment of peri-urban soils using seed germination and root elongation tests. *Environmental Science and Pollution Research*, 26:34401-34411.
- Zhang, W., Calvo-Polanco, M., Chi Chen, Z. and Zwiazek, J.J. (2013).** Growth and physiological responses of trembling aspen (*Populus tremuloides*), white spruce (*Picea glauca*) and tamarack (*Larix laricina*) seedlings to root zone pH. *Plant and Soil*, 373:775-786.

**Zhang, W. and Zwiazek, J.J. (2016a).** Responses of reclamation plants to high root zone pH: effects of phosphorus and calcium availability. *Journal of Environmental Quality*, 45:1652-1662.

**Zhang, W. and Zwiazek, J.J. (2016b).** Effects of root pH on root water transport and apoplastic pH in red-osier dogwood (*Cornus sericea*) and paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings. *Plant Biology*, 18:1001-1007.

**Zimmer, K., Zhang, Y., Lu, P., Chen, Y, Zhang, G., Dalkilic, M. and Zhu, C. (2016).** SUPCRTBL: A revised and extended thermodynamic dataset and software package of SUPCRT92. *Computers and Geosciences*, 90:97-111.

Les résultats de ce chapitre montrent que le pH est en fait un facteur clé pour le succès ou l'échec de l'implémentation d'une phytostabilisation sur décharge de laitier sidérurgique. Quand le pH du substrat est au-dessus de 8,6, la croissance des plantes et leur développement sont sévèrement restreints. Ceci est à la fois dû à la toxicité du Cr(VI), induisant des dommages oxydatifs, et à une carence en Mn, Zn et P. A l'inverse, une baisse du pH en dessous de 8,6 modifie la spéciation chimique de la plupart des éléments, conduisant à une diminution du Cr(VI) phytodisponible, conjointement à une augmentation du Mn, Zn et P phytodisponible. Cette démonstration révèle l'efficacité d'un apport de MIATE couplé à un contrôle de l'ajustement du pH du substrat en dessous de la valeur seuil de 8,6 pour optimiser la réussite de l'initiation d'une phytostabilisation sur dépôt de laitier d'aciérie. La recherche de conditions toujours plus optimales pour initier ce type de procédé reste néanmoins nécessaire du fait des lourdes contraintes environnementales s'exerçant sur le couvert végétal dès son implantation. Ceci passe, entre autre, par l'amélioration de la nutrition des plantes et la réduction de la bioaccumulation des éléments potentiellement toxiques contenus dans les laitiers. La bioaugmentation pour assister les procédés de phytostabilisation ayant déjà révélée des résultats prometteurs (cf. 1.2.b) § 3.), il a été convenu d'étudier dans le chapitre suivant les potentiels bénéfiques de l'inoculation d'un champignon mycorhizien à arbuscules, *Rhizophagus irregularis* (DAOM197198) qui est considéré comme modèle du fait des nombreuses études dont cette souche a fait l'objet, notamment dans des projets de phytomanagement. Étant donnés les résultats précédemment obtenus, une importance particulière est adressée au contrôle du pH de manière à s'affranchir des effets majeurs qu'il représente quant à notre problématique générale.



## **Chapitre 6: The use of *Rhizophagus irregularis* and Composted Sewage Sludge in aided-phytostabilization of steel slag to increase plants nutrition**

**Mathieu Scattolin<sup>1\*</sup>, Daniel Garcia<sup>1</sup>, Sébastien Roy<sup>2</sup>, Frédéric Paran<sup>1</sup>, Fernando Pereira<sup>1</sup> and Olivier Faure<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Moulin, Univ Lumière, Univ Jean Monnet, ENTPE, INSA Lyon, ENS Lyon, CNRS, UMR 5600 EVS, UMR 5307 LGF, Centre SPIN, Département PEG, F - 42023 Saint-Etienne, France*

*<sup>2</sup>Agronutrition, 31390 Carbonne, France*

*\*Corresponding author.*

*Mathieu Scattolin*

*Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Moulin, Univ Lumière, Univ Jean Monnet, ENTPE, INSA Lyon, ENS Lyon, CNRS, UMR 5600 EVS, UMR 5307 LGF, Centre SPIN, Département PEG, F - 42023 Saint-Etienne, France*

*Email: [mathieu.scattolin@mines-stetienne.fr](mailto:mathieu.scattolin@mines-stetienne.fr)*

**Article en préparation**



## Abstract

Steel slags are major by-products of the steel and iron industry. Particularly rich in metallic trace elements (Cr, Cu, Mn, Mo, Pb, W and Zn), steel slag dumps are devoided of organic matter, water retention capacity and exhibit very alkaline pH (> 10). Prone to spread metals they contain in ecosystems vicinity, those deposits have been proposed to be managed using aided-phytostabilization approach. However, those technosoils are unfavorable to accommodate plants colonization and the sustainability of a vegetation cover. This study aim at evaluating the potential benefit of using of a well-known arbuscular mycorrhizal fungi strain (*Rhizophagus irregularis* DAOM197198) to assist plants development on composted sewage sludge amended steel slag. Thus, a pot experiment was conducted to assess *Rhizophagus irregularis* supplying on an assemblage of herbaceous plant species focusing on mycorrhization rates, soil pore water's pH evolution and leaf ionome composition. Results showed that implementing a rapid mycorrhizal interaction on steel slag is possible. Furthermore, it lowers the soil pore water's pH even more than with the use of composted sewage sludge alone. As a consequence, *R. irregularis* inoculation leads to favor macronutrients acquisition of sown herbaceous species.

## 1. Introduction

The by-products formed during melting or elaboration of steel and alloys are called slags. This generic term includes several materials with different physicochemical and mineralogical characteristics depending on the metallurgical process used (Yildirim and Prezzi, 2011). Slags are mineral matrices mainly composed of iron, silicates, aluminates and lime, hosting various metals in high concentrations (*e.g.* Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, W, Zn, *etc.*) (Piatak *et al.*, 2015). Since the mid-1800s, large amounts of steel slags were produced and dumped without any protective measure. Exposed to wind and rainfalls susceptible to cause metal release and transfer, those metallurgical landfills constitute sources of contaminations for the environment and ultimately hazards for public health (Mayes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2017). It is thus necessary to develop reclamation methods improving the containment of these wastes. Owing to the present day volumes of unprotected slags in the environment, it is obvious that dig and dump conventional approaches are economically unfeasible and ecologically irrelevant. By contrast, phytostabilization approaches (Vangronsveld *et al.*, 2009; Mench *et al.*, 2010; Bolan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017) are cheap, environmentally friendly

and could be efficient for managing sustainably large and highly contaminated sites such as metallurgical slag dumps. The establishment of a plant community on a polluted site creates new habitats and ecological niches, which is beneficial to biodiversity and associated ecosystem functions. Further, it also improves the visual aspect of the site and consequently its social acceptance by local populations.

Phytostabilization approaches first rely on the trivial knowledge that a planted soil is far less subjected to mechanical erosion than a bare one. Vegetation covers intercept as well significant amounts of water, thus alleviating leakage toward groundwater. Additionally, plants root exudates favor the development of communities of microbes playing fundamental role in numerous soil functions (Nannipieri *et al.*, 2003; Giri *et al.*, 2005) and pedogenesis (Barea *et al.*, 2005; Rillig and Mummey, 2006; Pronk *et al.*, 2016). These microorganism-driven transformations may sustain nutrient supply and metal stabilization in soils (Lock and Janssen, 2003; Gadd, 2010; Remon *et al.*, 2013). But implementing a phytostabilization on metallurgical slags is a challenging issue (Bouchardon *et al.*, 2014; Oustriere *et al.*, 2016). Indeed, due to their extremely alkaline pH ( $> 10$ ), the abundance of potentially phytotoxic trace elements (TEs), the near absence of organic matter and nitrogen as well as their pebbly grainsize, steel slags are a very bad substrate for plant growth and development. Thus, they can hardly fulfill the functions of a living soil, as they lack most, if not all, of the key engineer species (bacteria, fungi, protozoan, nematodes, annelids, arthropods, plants, *etc.*) involved in soil biogeochemical cycles.

However, Bouchardon *et al.* (2014) and Oustriere *et al.* (2016) demonstrated that amended steel slags with composted sewage sludge (CSS), allowed colonization by drought tolerant and pseudo-metallophyte plant species. Furthermore, Scattolin *et al.* (2020) recently showed that amended slags whose pH is decreased below 8.6 before sowing both alleviate TEs availability and enhance the nutrients acquisition by vegetation. Although this methodology was successful in obtaining a dense plant cover, some TEs and particularly Al, Cr, Mo and W were still accumulated in above ground plant parts at relatively high levels, thereby representing a potential linkage towards herbivores and food webs (Ali and Khan, 2018). Due to its high alkalinity and Ca-rich composition, steel slags also severely limit P access for plants (Marshner, 2012). Therefore, enhancing nutrients acquisition and/or decreasing TEs accumulation in plants used for phytostabilizing slag dumpsites remains an important issue to improve the process. In this respect, stimulating the development of arbuscular mycorrhizal

fungi (AMF) symbioses (Meier *et al.*, 2012) could be a key factor. AMF are well-known for establishing symbiotic associations with roots of almost 80% of terrestrial plant species (Smith and Read, 2008), thereby improving mineral nutrition and water acquisition of their host (Jeffries *et al.*, 2003; Benett and Classen, 2020). In addition to a better tolerance to soil nutrient deficiencies and drought stress (Zhao *et al.*, 2015), there are a growing number of evidences that AMF could also immobilize some metals in their hyphae, and especially Cr (Wu *et al.* 2016), thereby decreasing the accumulation of toxic metals in plants (Hildebrandt *et al.*, 2007; Leung *et al.*, 2013). Several studies have indeed demonstrated the benefits of using indigenous AMF isolates for the phytostabilization of metal polluted soils (Lacercat-Didier *et al.*, 2016) and alkaline mine tailings (Orłowska *et al.*, 2010; Babu and Reddy, 2011). However, to our knowledge, no specialized AMF strain has been isolated from metallurgical slags to date. Therefore, the capability of AMF to establish symbiosis with plants grown on such a peculiar substrate, and their effect in stimulating plant development while decreasing metal accumulation remains largely unknown.

In this context, we hypothesized that using *Rhizophagus irregularis*, a generalist, easily commercially available AMF which has been used for a long time for agronomical practices, could be as efficient for phytostabilizing metallurgical slags. In order to test this hypothesis we performed a pot experiment on CSS-amended slag, to address the three following issues: *i/* can inoculation with Ri lead to root colonization on metallurgical slags? *ii/* does mycorrhization promote plant development on such a substrate? *iii/* does mycorrhization mitigate Al, Cr, Mo, W accumulation in leaves of plants grown on metallurgical slags?

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Pots preparation and soil pore water (SPW) sampling*

Steel slag used in this study was taken from a metallurgical landfill (45°26' N, 4°17' E) located at Châteauneuf (Loire, France). Agronomic characteristics, major and trace elements of the slag and CSS as well as pots culture protocol used in that study were presented in Scattolin *et al.* (2020). Soil pore water was periodically sampled by means of rhizons (two per pot) and analysed for major and trace metallic elements. The pH of each SPW sample was immediately measured from both rhizons of each pot at the day of sowing (d0), using a Consort C832 pH-meter equipped with a combined glass electrode. In order to investigate the

potential effect of Ri inoculation on SPW, its pH was measured again two months after sowing (d60).

## 2.2. Plant culture and Ri inoculation

Pot experiments were performed to assess the combined effects of CSS amendment and Ri inoculation on plant growth, nutrients and metal accumulation of an herbaceous plant assemblage made of 5 species. Plant species were chosen according to Bouchardon *et al.* (2014), i.e: *Achillea millefolium* (L.), *Bromus erectus* Huds, *Festuca arundinacea* Schreb, *Melilotus officinalis* (L.) Lam and *Medicago sativa* (L.). Sowing was performed using a seed density of 6 g.m<sup>-2</sup>. Respective mass proportions of each species were the followings: 45% for *B. erectus*, 25% for *F. arundinacea*, 12.5% for *M. officinalis* and *M. sativa* and 5% for *A. millefolium*.

Spores of the Ri isolate DAOM197198 were provided by Agronutrition (Haute Garonne, France). Inoculate was provided at a concentration of 1000 spores.mL<sup>-1</sup> in a preservative solution, and rinsed twice with sterile distilled water before use. Plant inoculation (Ri) was performed during sowing by adding 6 mL of the rinsed spore solution (i.e. approx. 20 spores.cm<sup>-2</sup>) while uninoculated control pots received instead 6 mL of distilled water (Ri0). Pots without CSS amendment were neither seeded nor inoculated and served as negative controls.

## 2.3. Plant harvesting and analysis

At the end of the culture, entire plants were harvested, and thoroughly washed with deionized water. For the determination of AMF colonization, twenty root fragments (about 1 cm in length) were taken for each species and culture condition, from randomly selected plants. Root samples were first cleared with 10% KOH (80°C, 10 minutes) and rinsed with distilled water, before staining with a 0.05% trypan blue solution (80°C, 15min). Root colonization was quantified under optical microscope according to Trouvelot *et al.* (1986). The following parameters were calculated: frequency of mycorrhization (F%), percentage of root cortex colonization (M%), overall abundance of arbuscules (A%), intensity of colonization within individual mycorrhizal roots (m%) and arbuscule richness in root fragments where arbuscules were present (a%).

Subsamples of roots and shoots were then separated and dried at 60°C until constant weight. For each species, total shoot dry weight was measured and leaf samples were digested to evaluate above ground biomass content. Leaves digestion protocol has been described in Scattolin *et al.* (2020). Because of the impossibility to separate roots from different species, only dry shoot weights and foliar elements content are presented here.

#### 2.4. Pots subset selection

Despite our attempts to use always the same design, to make replicates and to randomize the pots, many remained poorly successful in growing a vigorous plant community. As already explained in the companion paper (Scattolin *et al.* (2020), the most effective parameter that correlates with the success or failure of the growth was found to be the SPW at the beginning of the experiment (d0), with a cutoff at pH = 8.6. This is why, to delineate the effects of AFM inoculation, we extracted from the full experiment a subset of (successful) pots with pH (d0) < 8.6 and rejected the other (much less successful) ones.

#### 2.5. Statistical analysis

All statistical calculations and plot drawings were performed using R software (R core Team, 2017). Mycorrhization status between plants species were compared using Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks, with p-values corrected by the Holm adjustment method. Comparisons between Ri-inoculated and control pots, regarding the SPW's pH, shoot dry weight production and leaf contents of each plant species were compared using the Wilcoxon rank sum test, with Holm's p-adjust method for multiple comparisons. Significance levels and related symbols in graphical plots were as follows:  $p > 0.1$ , non-significant (NS);  $0.05 < p < 0.1$ , poorly significant (\*);  $0.01 < p < 0.05$ , significant (\*\*);  $p < 0.01$ , highly significant (\*\*\*).

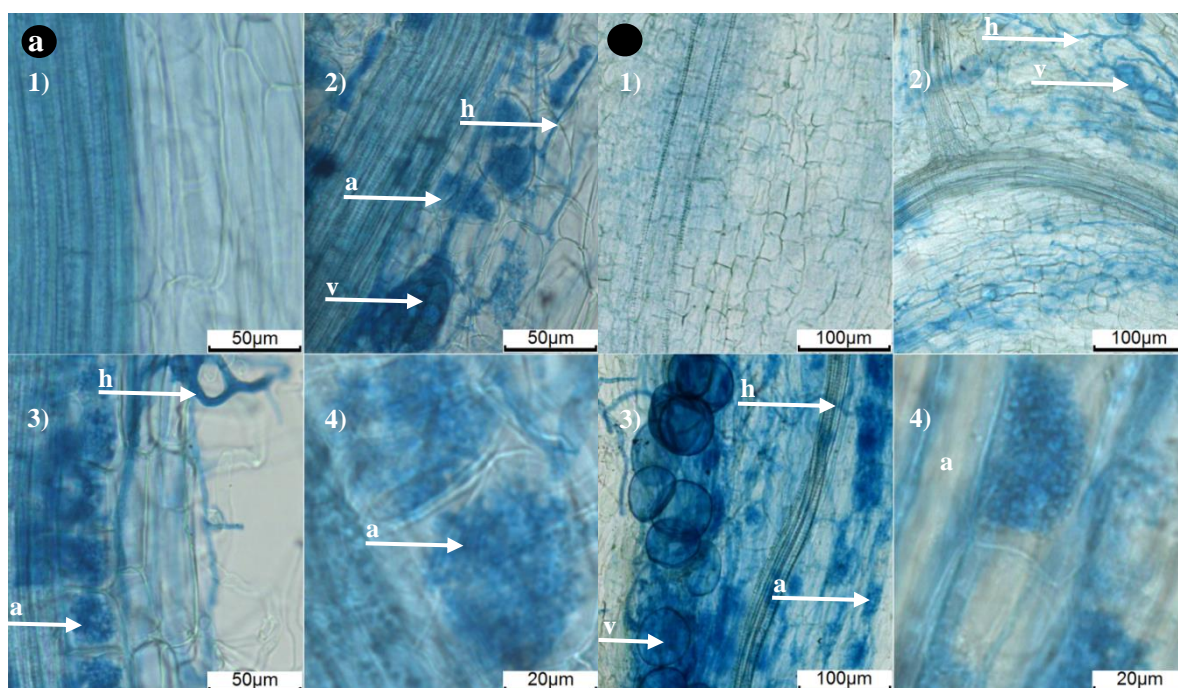
### 3. Results

#### 3.1. Root colonization rates by *Rhizophagus irregularis*

The efficiency of root colonization by Ri was estimated after 75 days of cultivation on pots exhibiting initial SPW (d0) pH < 8.6. Among the five plant species of the initial assemblage,



*A. millefolium* did not grow in sufficient number for replicates to be analyzed. Indicators of root colonization for *F. arundinacea*, *B. erectus*, *M. officinalis* and *M. sativa* are shown in Table I. Results showed that all studied species were colonized by Ri. F% ranged from 70 to 100 %, M% from 11.0 to 18.0 %, A% from 2.3 to 3.1 %, m% from 11.9 to 22.5 and a% from 17.4 to 21.0 %. The lowest F% was obtained for *M. officinalis*. Besides that difference, the four plant species look similarly colonized by Ri. Fig. 1 illustrates the typical mycorrhizal structure observed on Fescues and Melilots.



**Figure 1:** *R. irregularis* typical structures observed by optical microscopy on *F. arundinacea* (b) and *M. officinalis* (b) roots fragments with: unmycorrhized fragment (1), mycelial hyphae (h), vesicles (v) and arbuscules (a) (2 and 3) and arbuscules (a) (4)

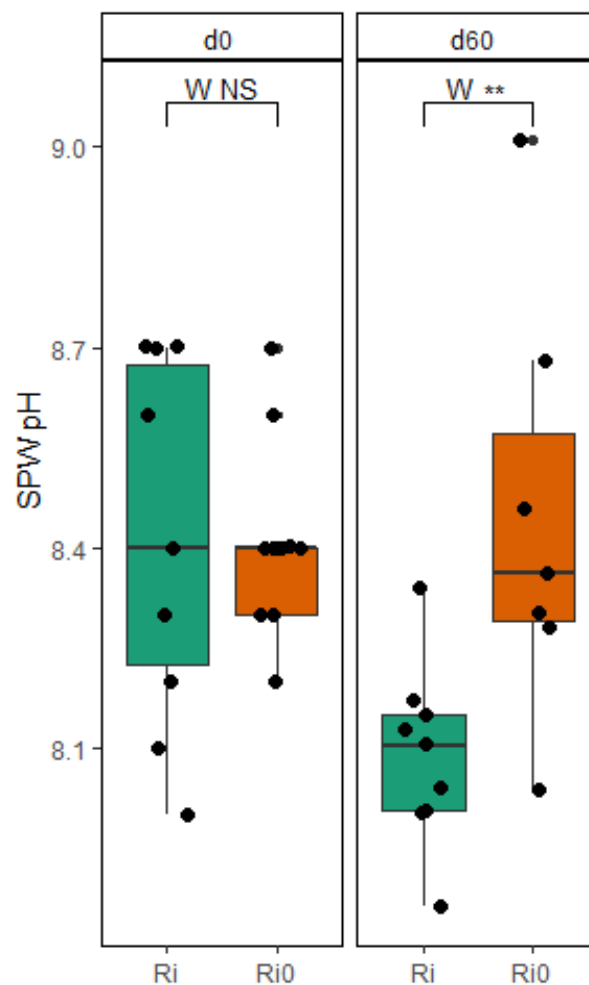
**Table I:** Mycorrhization rates (t75) obtained for plant species grown in slag amended with

CSS exhibiting SPW (t0) pH < 8.6 (median  $\pm$  SE)

Species	F%	M%	A%	m%	a%
<i>F. arundinacea</i>	100 ( $\pm$ 9) (a)	11.9 ( $\pm$ 10.6) (a)	2.4 ( $\pm$ 4.1) (a)	11.9 ( $\pm$ 10.5) (a)	19.4 ( $\pm$ 11.0) (a)
<i>B. erectus</i>	100 ( $\pm$ 13) (a)	14.9 ( $\pm$ 7.0) (a)	3.0 ( $\pm$ 1.7) (a)	17.5 ( $\pm$ 7.3) (a)	17.4 ( $\pm$ 9.3) (a)
<i>M. officinalis</i>	70 ( $\pm$ 31) (b)	11.0 ( $\pm$ 16.0) (a)	2.3 ( $\pm$ 6.4) (a)	15.7 ( $\pm$ 18.1) (a)	21.0 ( $\pm$ 13.5) (a)
<i>M. sativa</i>	80 ( $\pm$ 17) (a)	18.0 ( $\pm$ 6.0) (a)	3.1 ( $\pm$ 1.4) (a)	22.5 ( $\pm$ 6.5) (a)	17.2 ( $\pm$ 6.5) (a)

### 3.2. Effect of Ri inoculation on SPW's pH

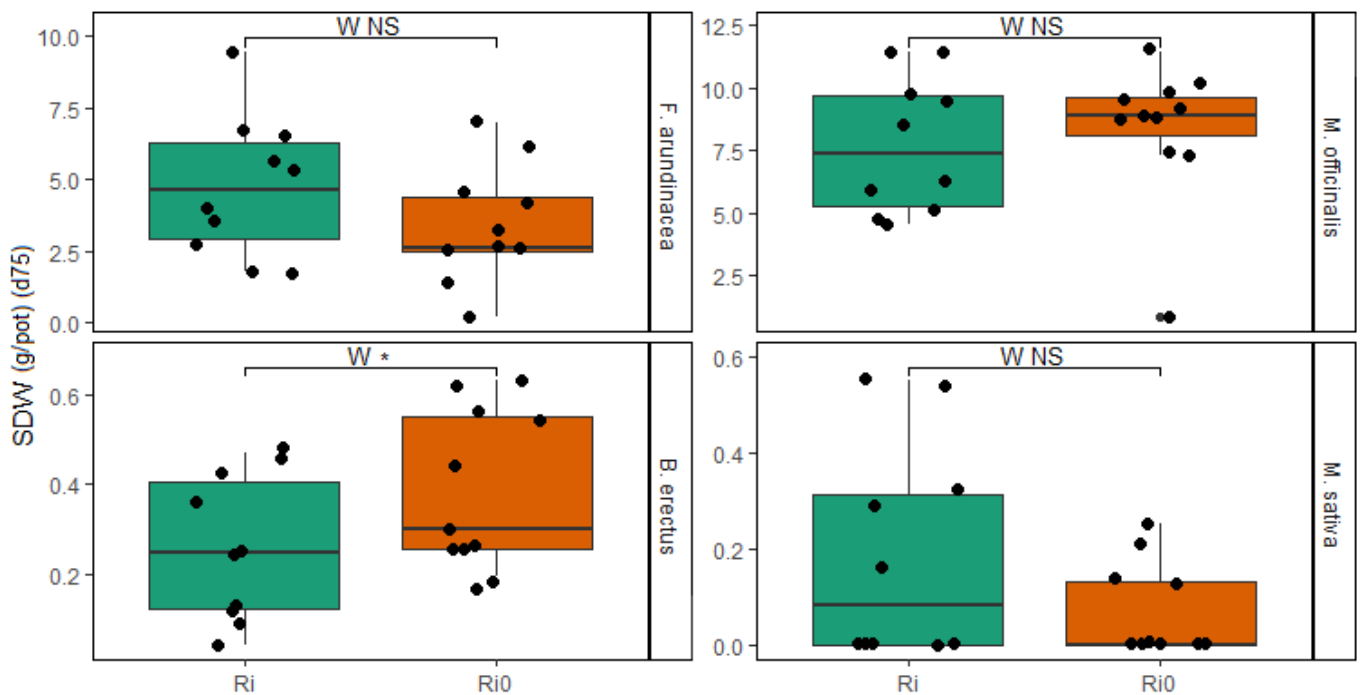
SPW's pH corresponding to inoculated plants (Ri) and uninoculated ones (Ri0) were compared at sowing time (d0) and 2 months next (d60) (Fig. 2). SPW (d0) pH was not significantly different between Ri and Ri0, averaging 8.4 before sowing. After two months, SPW (d60) pH of plants inoculated with Ri was significantly lower than control plants: where median Ri0 remained constant at 8.4, those from Ri dropped to about 8.1.



**Figure 2:** SPW pH measured at sowing time (d0) and 2 months after (d60) comparing inoculated (Ri) with uninoculated pots (Ri0)

### 3.3. Plants development affected by Ri inoculation

SDW (t75) of *F. arundinacea*, *B. erectus*, *M. officinalis* and *M. sativa* are shown in fig. 3. Fescues and Alfalfas inoculated with Ri produced slightly more SDW (respective medians of about 5 and 0.1 g) than those uninoculated (respectively about 2.5 and 0 g) but differences were not significant (p-values = 0.22 and 0.24 respectively). Melilots SDW were not affected by Ri inoculation (p-value = 0.44) with medians reaching 7.5 g for Ri and 9.0 g for Ri0. Brome is the only plant species that expressed significantly different SDW (t75) production from Ri to Ri0, respectively reaching 0.25 and 0.30 g.



**Figure 3:** Shoot dry weight (d75) produced by *Festuca arundinacea*, *Bromus erectus*, *Melilotus officinalis* and *Medicago sativa* comparing inoculated (Ri) with uninoculated pots (Ri0)



### 3.4. Plants ionome in response to Ri inoculation

Overall, Al and Cr concentrations in plant leaves were similar when comparing Ri with Ri0 and for each plant species. Although non-significant, the highest Cr, Mo and W foliar contents were found in Fabaceae species: Ri inoculation slightly increased the accumulation of those metals. Mycorrhized *M. sativa* exhibited significantly higher foliar Mo than Ri0. For all plant species, W amounts in leaf tissues were affected by mycorrhization: Ri inoculation lead to decrease W concentration in Fescues leaves of about 15 % whereas it increased in those of Bromes, Melilots and Alfalfas of respectively 31, 18 and 45 % (Fig. 4).

Both plant species that had grown the best exhibited higher K amounts in there leaves when Ri was inoculated: K leaf contents of inoculated Fescues and Melilots were about 20 and 44 % higher, respectively. Similar trends were observed on foliar P content since Ri inoculation lead to increase its concentration in leaves of all plant species: mycorrhized Fescues, Bromes, Melilots and Alfalfas had respectively 10, 10, 30 and 77 % higher concentrations of P in their leaves than those uninoculated. Mg leaf concentrations of Fescues and Alfalfas remained similar by inoculating Ri or not. In Bromes leaves, inoculating Ri increased the Mg content of 18 % where it conversely decreased that of Melilots of about 15 %. Mycorrhized Fescues exhibited 9 % less S in their leaves than those grown without Ri. For the three other species, Ri favored the acquisition of S in leaf tissues of about 12, 22 and 23 %, respectively for Bromes, Melilots and Alfalfas (Fig. 5).

Ni foliar contents were not significantly different between Ri-inoculated and control plants, for each species (data not shown). Cu, Mn and Zn leaf contents of Poaceae species were not affected significantly by mycorrhization. *M. officinalis* get higher Cu contents in leaves in Ri than in Ri0, mycorrhization thus enhanced its foliar Cu of about 15 %. Conversely, inoculating Ri lowered foliar Mn and Zn of *M. sativa* of 47 and 85 %, respectively (Fig. 6).

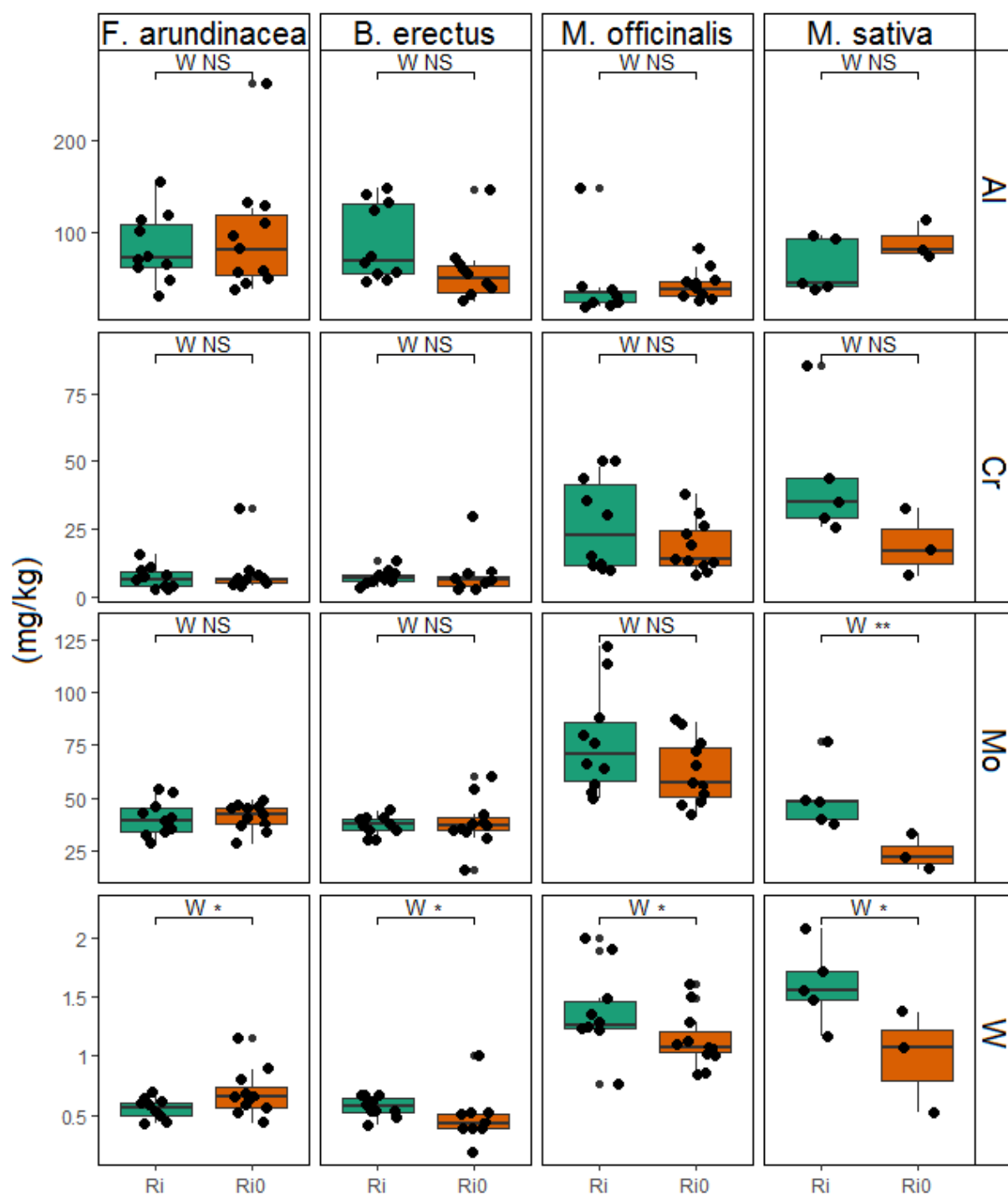


Figure 4: Al, Cr, Mo and W concentrations in leaves of *Festuca arundinacea*, *Bromus erectus*, *Melilotus officinalis* and *Medicago sativa* (d75) comparing inoculated (Ri) with uninoculated pots (Ri0)

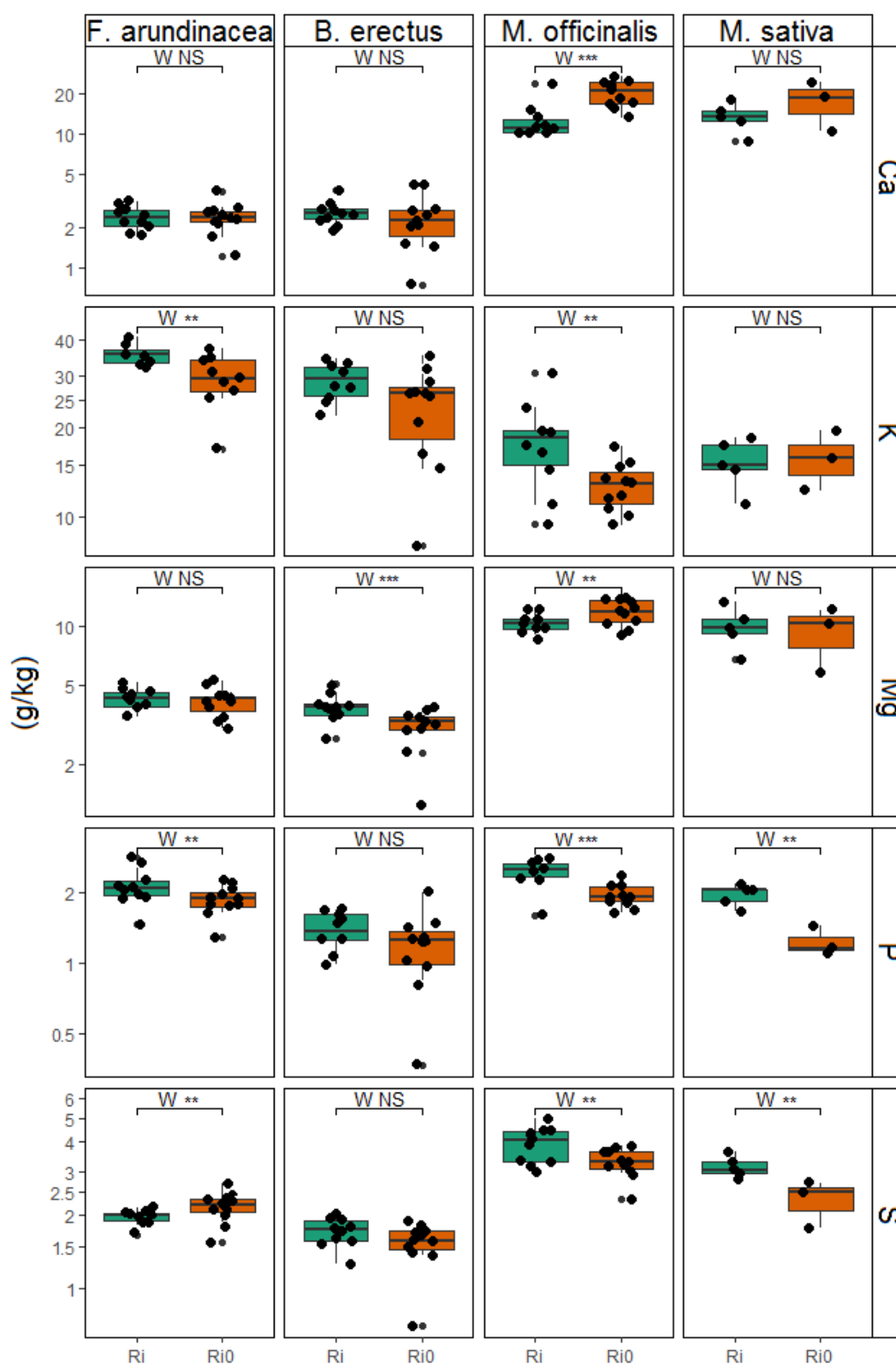
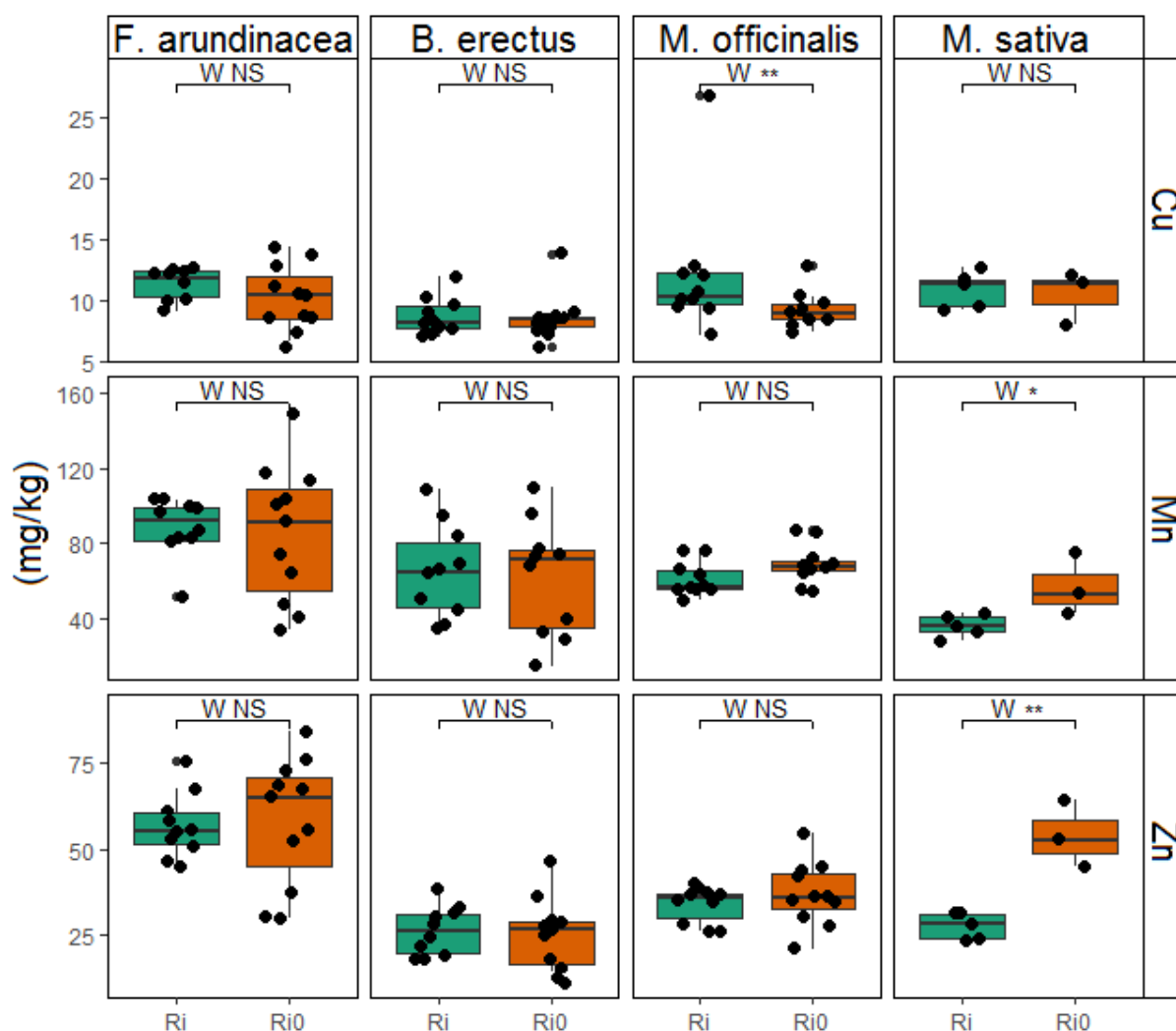


Figure 5: Ca, K, Mg, P and S concentrations in leaves of *Festuca arundinacea*, *Bromus erectus*, *Melilotus officinalis* and *Medicago sativa* (d75) comparing inoculated (Ri) with uninoculated pots (Ri0)



**Figure 6:** Cu, Mn and Zn concentrations in leaves of *Festuca arundinacea*, *Bromus erectus*, *Melilotus officinalis* and *Medicago sativa* (d75) comparing inoculated (Ri) with uninoculated pots (Ri0)

#### 4. Discussion

We do not discuss here why plant growth was more successful in some pots than in others, since the companion paper (Scattolin *et al.* 2020) discusses the variability of SPW at the d0 stage (due to pot preparation, internal heterogeneity, slag grain size, *etc.*). In the following, we only discuss the sample subset with a successful growth and SPW (d0) < 8.6.

#### 4.1. *Ri* colonized plants grown on slag amended with CSS

Mycorrhization countings revealed that *Ri* inoculation led to fungal colonization of all sown plant species at harvesting (t75) (Table 1). Those results are in accordance with previous highlights conducted on AMF development in response to various abiotic conditions, such as pH (Kumar *et al.*, 2010), salinity (Kaya *et al.*, 2009), oxidative stress induced by organic (Debiane *et al.*, 2009) or inorganic pollution (Hildebrandt *et al.*, 2007) as well as high CaCO<sub>3</sub> concentrations (Labidi *et al.*, 2012). Indeed, they suggested that the exposure to stressful environmental conditions affects the mycorrhizal interactions but never up to complete inhibition. Concerning mycorrhization rates, the only statistical difference was found on the frequency of mycorrhization (F%) of Melilots as the lowest of all grown species. In fact, Tawaraya *et al.* (2003) and Guo *et al.* (2008) have studied how mycorrhizal dependency varied among species and cultivars through the ability of plant roots to acquire P from soils. However, the other mycorrhization rates were quite homogeneously distributed among all plant species. This is in agreement with Oehl *et al.* (2011) and Janouskova *et al.* (2017) who studied AMF propagation between different host-plant species in pot culture and demonstrated how some species of *Glomus* depend of that dispersion strategy. Overall, mycorrhizal colonization rates were heterogeneous in each plant species. That could be explained by variations of the initial SPW's pH (Fig. 1). High saline-alkaline media were found to be harmful for spore germination, roots fungal colonization and hyphal growth of AMF (Juniper and Abbott, 2006; Soti *et al.*, 2015). Some studies have also suggested that variations in plants density, through inter- (Pérez and Urcelay, 2009) or intraspecific competition (Schroeder et Janos, 2005), could also be responsible of those kind of heterogeneities since plant density remained an uncontrolled parameter in our study.

#### 4.2. *Ri* inoculation lowered SPW's pH

Inoculated pots exhibited a lowered SPW (d60) pH to 8.1 while control ones remained at 8.4 (Fig. 2). pH changes induced by roots are mainly due to H<sup>+</sup> or OH<sup>-</sup> release during nutrients uptake to compensate for cellular cation-anion imbalance. In addition, the release of organic acids by roots (*e.g.* citric, oxalic and malic acid) (Jones *et al.*, 2003), the microbial and root respiration as well as the biological redox-coupled reactions would also modify pH into the rhizosphere (Hinsinger *et al.*, 2003). SPW's pH has evolved differently between *Ri* and *Ri*0, suggesting an enhancement of inoculated rhizosphere activity and thus a proof of the fungal-

roots interaction. Lowering the pH of the slag has potentially changed plants development, their accumulation rates of harmful metals but also the macro- and micronutrients acquisition (Scattolin *et al.*, 2020). However, except for *B. erectus* who never developed more than 1 g of SDW, aboveground biomasses were not different between Ri- and Ri0-plants within each species (Fig. 3). This is consistent with Van der Heijden *et al.* (2006) and Li *et al.* (2006) who did not observe any increase in total plants productivity nor positive growth in response to mycorrhizal inoculation. Even if *F. arundinacea* SDW (t75) were not significantly different by comparing Ri with Ri0, they respectively reached medians of about 5 and 2.5 g. The lower Fescues aboveground biomass obtained in Ri0 may be related to the higher SDW produced by Bromes since the reduced installation of *Poaceae* in these pots may have softened the interspecific competition.

#### 4.3. Plants nutrition and metals accumulation affected by Ri

Employing Ri did not lead to different Cr or Al accumulation rates for any plants species. Reducing the subset selection to a lower initial pH range (*e.g.* SPW (d0) pH < 8.35) could eventually reveal other trends, but the number of remaining individuals would have dropped below statistical significance. Concerning the fate of Cr, the published work that shows most similarities with ours is that of Wu *et al.* (2014; 2015; 2016). These authors studied the same strain (*Rhizophagus irregularis* DAOM 197198) but used instead Dandelion, Bermudagrass and Carrot plant species. Moreover, they adjusted their experimental pH to respectively 5.50, 7.30 and 8.50 while the pH range investigated in the present study is more restricted (8.1-8.6) and slightly higher; this difference may be crucial for AMF inoculation since soil pH strongly affects mycorrhizal colonization and development (Juniper and Abbott, 2006; Goranson *et al.*, 2008; Soti *et al.*, 2015). Furthermore, the growth substrates they used were artificially supplemented with various amounts of Cr or P while ours were obtained by mixing raw slag and CSS. In these contrasted contexts, it is not surprising that most of their conclusions concerning Cr accumulation in plants leaves are different from ours.

We switch now to the behaviour of other metals like Mo and W. *Fabaceae* species exhibited slightly higher Mo and W foliar amounts upon *R. irregularis* inoculation. Mo and W are present in the active sites of metalloenzymes implied in key transformations of N, S, As, Se and Cl metabolisms (Stiefel, 2002). In particular, N<sub>2</sub>-fixing bacteria establishing symbiosis with leguminous plants use Mo as an enzymatic co-factor (Bambara and Ndakidemi, 2010).

Moreover, bacterial Mo-nitrogenase has been found functional even in cases where Mo is substituted by W (Schwarz *et al.*, 2007; Bevers *et al.*, 2009). Some studies have hypothesized W uptake and sequestration are involved in toxicity mechanisms in plants (Strigul *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2009; Oburger *et al.*, 2018) but the discovery of W functional role in biological systems remains recent and poorly explored. Foliar W of both *Poaceae* species displayed significantly different responses to Ri inoculation. Although exhibiting opposite trends, these responses highlight the AMF ability to change W uptake by vegetation. Further investigations are required for application to phytomanagement projects where W toxicity is crucial.

*F. arundinacea* and *M. officinalis* were positively affected by Ri since it increased K uptake. This is consistent with Garcia and Zimmerman (2014), who advocated that K uptake by plants may contribute to their drought tolerance. On the other hand, mycorrhized Melilots exhibited lower Mg in their leaf than those of Ri0; however, Scattolin *et al.* (2020) have shown that *Fabaceae* species grown in slag amended with CSS were far to be Mg-deficient. Inoculated plant species exhibited statistically higher foliar P than control plants (except for Bromes: p-value = 0.15). It is indeed the most commonly reported nutrient enhanced in AMF hosts plants. In the current work, no significant SDW enhancement was attributed to Ri inoculation whereas the increased concentration of P in leaves of plants was. These results are in broad agreement with other studies that aimed at evaluating AMF-plants effects (Smith *et al.*, 2003; Van der Heijden *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). In addition, *Fabaceae* species acquired more S in their leaves upon Ri inoculation. Sulfur is indeed embedded in plenty of biological compounds (*e.g.* thiols, proteins, vitamins, chlorophyll, *etc.*). It was also shown that *R. irregularis* could alleviate S-deficiency symptoms either by lowering the expression of sulfur starvation-related genes, or by activating sulfate transporter genes (Sieh *et al.*, 2013; Giovannetti *et al.*, 2014) therefore improving the S nutritional status. In our experiments, Ri-Fescues exhibited slightly lower S concentrations in their leaves than Ri0 ones; however, Sieh *et al.* (2013) have shown that P is of greater importance than S for plants global metabolism since P-starved plants were not additionally impacted by S-depletion.

Ri has increased Cu acquisition in leaves of Melilots by comparison with control. However, it lowered the foliar Mn and Zn in *M. sativa* close to deficiency thresholds respectively fixed to 30 mg/kg and 20 mg/kg by Kabata-Pendias (2011). Nonetheless, both Ri- and Ri0-Alfalfas

growth remained poorly advanced at harvesting time, suggesting their development were not impacted by the low availability of those micro-nutrients.

Most metals drive Reactive Oxygen Species (ROS) production through autoxidation and Fenton reaction, resulting in oxidative damages for plants. Yao *et al.* (2011) demonstrated that higher concentration of P in plant tissues reduces the formation of ROS. Similarly, Silva *et al.* (2019) showed that applying phosphate to sugarcane crops decreased the activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase antioxidant enzymes, thus suggesting a lower oxidative stress for P-supplemented plants. In addition, besides its widespread importance in the metabolism, P is obviously involved in the phosphate pentose pathway that generates NADPH: the latter is essential to reduce glutathione in charge of cell redox state regulation, hence it protects organism from oxidative damages. Mycorrhizal roots generally contain more soluble phenolic compounds, glutathione as well as secondary metabolites than unmycorrhized ones, suggesting the improvement of AMF-plants defense systems against ROS (Schützendübel *et al.*, 2001).

## 5. Conclusions

The current study primarily revealed that inoculating herbaceous species grown in CSS-amended slag with *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 leads to a quick root system colonization. Furthermore, SPW pH of Ri-plants have significantly decreased two months after seeding by comparison with uninoculated plants: this pH shift can be taken as an evidence of the mycorrhizal interaction as well as an interesting feature for dumped slags phytomanagement, since lowering the SPW's pH almost directly decreases the mobility of Cr in these technosoils.

Mycorrhization did not change measurably the plant biomass, but it enhanced the acquisition of macro-nutrients in their leaves, namely P, K and S, at least in the subset of individuals successfully driven by CSS amendment to a favorable SPW pH (< 8.6). This enhancement could improve the sustainability of the vegetation cover, as well as its recovery from one year to the next, but further long-terms experiments are needed to assess this important issue.

Cr and Al concentrations in plants leaves have been poorly affected by Ri supplementation. In contrast, foliar Mo and W of Fabaceae responded strongly to Ri inoculation, suggesting that AMF strains could be helpful for their recovery.



Supplementary experiments are required to address the ability of other AMFs to promote plant growth in slag, and one promising idea is to use indigenous strains that would be prospected from ancient slag deposits. A particular importance has to be given to the substrate pH monitoring *in situ* in order to identify finer trends.

## References

- Yildirim, I.Z. and Prezzi, M. (2011).** Chemical, Mineralogical, and Morphological Properties of Steel Slag. *Advances in Civil Engineering*, 2011, 13 pp.
- Piatak, N. M., Parsons, M. B. and Seal, R. R. (2015).** Characteristics and environmental aspects of slag: a review. *Applied Geochemistry*, 57:236-266.
- Pandia, O., Saracin, I., Dobrota, D., Ganea-Christu, I. and Marin, G. (2016).** The management of steel industry in the context of durable development. *Annals of the Faculty of Engineering Hunedoara*, 14:179-182.
- Mayes, W. M., Younger, L. and Aumônier, J. (2008).** Hydrogeochemistry of alkaline steel slag leachates in the UK. *Water, Air, and Soil Pollution*, 195:35-50.
- Gomes, H. I., Mayes, W. M., Rogerson, M., Stewart, D. I. and Burke I. T. (2016).** Alkaline residues and the environment: a review of impacts, management practices and opportunities. *Journal of Cleaner Production*, 122:3571-3582.
- Da Silva, W.R., Da Silva, F.B.V., Araujo, P.R.M. and Do Nascimento, C.W.A. (2017).** Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144:522-530.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D. and Mench, M. (2009).** Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Sciences and Pollution Research*, 16:765-794.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.P., Gawronski, S.W., Schröder, P., and Vangronsveld, J. (2010).** Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST action 859. *Journal of Soils and Sediments*, 16:876-900.
- Bolan, N.S., Park, J. H., Robinson, B., Naidu, R. and Huh, K. Y. (2011).** Phytostabilization: a green approach to contaminant containment. *Advances in Agronomy*, 112:145-204.
- Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R. and Sun, W. (2017).** A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 184:594-600.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G. (2003).** Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54:655-670.

- Giri, B., Giang, P.H., Kumari, R., Prasad, R. and Varma, A. (2005).** Microbial diversity in soils. In: Varma A., Buscot F. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Soil biology, vol 3.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 19-55.
- Barea, J.M., Azcon, R. and Azcon-Aguilar, C. (2005).** Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Varma A., Buscot F. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Soil biology, vol 3.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 195-212.
- Rillig, M.C. and Mummey, D.L. (2006).** Mycorrhizas and soil structure. *New phytologist*, 171:41-53.
- Pronk, G.J., Heister, K., Vogel, C., Babin, D., Bachmann, J., Ding, G.C., Ditterich, F., Gerzabek, M.H., Giebler, J., Hemkemeyer, M., Kandeler, E., Mouvenchery, Y.K., Miltner, A., Poll, C., Schaumann, G.E., Smalla, K., Steinbach, A., Tanuwidjaja, I., Tebbe, C.C., Wick, L.Y., Woche, S.K., Totsche, K.U., Schlöter, M. and Kögel-Knaber, I. (2016).** Interaction of minerals, organic matter, and microorganisms during biochemical interface formation as shown by a series of artificial soil experiments. *Biology and Fertility of Soils*, 53:9-22.
- Lock, K. and Janssen, C.R. (2003).** Influence of aging on copper bioavailability in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:1162-1166.
- Gadd, G.M. (2010).** Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156:609-643.
- Remon, E., Bouchardon, J-L., Le Guédard, M., Bessoule, J-J., Conord, C. and Faure, O. (2013).** Are plants useful as accumulation indicators of metal bioavailability? *Environmental Pollution*, 175:1-7.
- Bouchardon, J.L., Faure, O., Lespagnol, G., Moutte J., Guy, B., Mimoun, D., Graillot, D., Paran, F., Croze, V., Athénol, J.D., Fernando, B., Boisson, J., Perret, S., Hitmi, A., Verney, P., Moussard Gauthier, C., Ledoigt, G. , Goupil, P., Sac, C. and Mench, M. (2014).** Physafimm: La phytostabilisation, méthodologie applicable aux friches industrielles, métallurgiques et minières. *Rapport final, convention ADEME n° 0872C0119, ADEME Ed.*, 158 pp.
- Oustriere, N., Marchand, L., Bouchardon, J. L., Faure, O., Moutte, J. and Mench, M. (2016).** Aided phytostabilization of a trace element-contaminated technosol developed on steel mill wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 320:458-468.

- Scattolin, M., Peuble, S., Pereira, F., Pran, F., Moutte, J., Menad, N. and Faure, O. (2020).** pH as a key-factor in the success or failure of aided-phytostabilization of metallurgical slag. *Journal of hazardous Materials, In press.*
- Ali, H. and Khan, E. (2018).** Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs–Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and ecological risk assessment: an International Journal*, 25(6):1353-1376.
- Marschner, P. (2012).** Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants – Third Edition. *Academic Press, Elsevier*, 651 pp.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N. and Cornejo, P. (2012).** Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42:741-775.
- Smith, S.E. and D J. Read. (2008).** Mycorrhizal Symbiosis. *Third edition. Academic Press, New York, New York, USA.*
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. and Barea, J-M. (2003).** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 37:1-16.
- Benett, A.E. and Classen, A.T. (2020).** Climate change influences mycorrhizal fungal–plant interactions, but conclusions are limited by geographical study bias. *Ecology*, 101(4).
- Zhao, R., Guo, W., Bi, N., Guo, J., Wang, L., Zhao, J. and Zhang, J. (2015).** Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays* L.) grown in two types of coal mine spoils under drought stress. *Applied Soil Ecology*, 88:41-49.
- Wu, S., Zhang, X., Chen, B., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., Sun, Y. and Wang, Y. (2016).** Transformation and Immobilization of Chromium by Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Revealed by SEM–EDS, TEM–EDS, and XAFS. *Environmental Science & Technology*, 49:14036-14047.
- Hildebrandt, U., Regvar, M. and Bothe, H. (2007).** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68:139-146.
- Leung, H-M., Wang, Z-W., Ye, Z-H., Yung, K-L., Peng, X-L. and Cheung, K-C. (2013).** Interactions between arbuscular mycorrhizae and plants in phytoremediation of metal-contaminated soils: a review. *Pedosphere*, 23:549-563.
- Lacercat-Didier, L., Berthelot, C., Foulon, J., Errard, A., Martino, E. and Chalot, M. (2016).** New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance. *Mycorrhiza*, 26:657-671.

- Orłowska, E., Orłowski, D. and Mesjasz-Przybyłowicz, J. (2010).** Role of Mycorrhizal Colonization in Plant Establishment on an Alkaline Gold Mine Tailing. *International Journal of Phytoremediation*, 13:185-205.
- Babu, A.G. and Reddy, M.S. (2011).** Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and nutrient status of bermudgrass grown in alkaline bauxite processing residue. *Environmental pollution*, 159(1):25-29.
- Trouvelot, A., Kough, J.L. and Gianinazzi-Pearson, V. (1986).** Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche et méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (Eds), Physiological and genetical aspects of mycorrhiza. *INRA Presse*, Paris, 217-221.
- R Core Team (2017).** R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Kumar, A., Mangla, C., Aggarwal, A. and Parkash, V. (2010).** Arbuscular mycorrhizal fungal dynamics in the rhizospheric soil of five medicinal plant species. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 6:281-288.
- Kaya, C., Ashraf, M., Sonmez, O., Aydemir, S., Tuna, A.L., Cullu, M.A. (2009).** The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity, *Scientia Horticulturae*, 121:1-6.
- Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Shirali, P., Grandmougin-Ferjani, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2009).** Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry*, 70:1421-1427.
- Labidi, S., Jeddi, F.B., Tisserant, B., Debiame, D., Rezgui, S., Grandmougin-Ferjani, A., Sahraoui, A.L. (2012).** Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO<sub>3</sub> stress. *Mycorrhiza*, 22:337-345.
- Tawaraya, K. (2003).** Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(5):655-668.
- Guo, D., Xia, M., Wei, X., Chang, W., Liu, Y. and Wang, Z. (2008).** Anatomical traits associated with absorption and mycorrhizal colonization are linked to root branch order in twenty-three Chinese temperate tree species. *New Phytologist*, 180(3).
- Oehl, F., Schneider, D., Sieverding, E. and Burga, C.A. (2011).** Succession of arbuscular mycorrhizal communities in the foreland of the retreating Morteratsch glacier in the Central Alps. *Pedobiologia*, 54:321-331.

- Janouskova, M., Krak, K., Vosatka, M., Puschel, D. and Storchova, H. (2017).** Inoculation effects on root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities spread beyond directly inoculated plants. *PLOS ONE*, 12(7).
- Juniper, S. and Abbott, L.K. (2006).** Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16:371-379.
- Soti, P.G., Jayachandran, K., Koptur, S. and Volin, J.C. (2015).** Effect of soil pH on growth, nutrient uptake, and mycorrhizal colonization in exotic invasive *Lygodium microphyllum*. *Plant Ecology*, 216(7):989-998.
- Pérez, M. and Urcelay, C. (2009).** Differential growth response to arbuscular mycorrhizal fungi and plant density in two wild plants belonging to contrasting functional types. *Mycorrhiza*, 19:517-523.
- Schroeder, M.S. and Janos, D.P. (2004).** Plant growth, phosphorus nutrition, and root morphological responses to arbuscular mycorrhizas, phosphorus fertilization, and intraspecific density. *Mycorrhiza*, 15:203-216.
- Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G. and Van Hees, P.A.W. (2003).** Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*, 248:31-41.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. and Jaillard, B. (2003).** Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248:43-59.
- Van Der Heijden, M.G.A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, I., Boller, T., Wiemken, A. and Sanders, I.R. (2006).** The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172:739-752.
- Li, H., Smith, S.E., Holloway, R.E., Zhu, Y. and Smith, F.A. (2006).** Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist*, 172:536-543.
- Wu, S., Chen, B., Sun, Y., Ren, B., Zhang, X. and Wang, Y. (2014).** Chromium resistance of dandelion (*Taraxacum platyepidum* Diels.) and bermudagrass (*Cynodon dactylon* [Linn.] Pers.) is enhanced by arbuscular mycorrhiza in Cr(VI)-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9).
- Wu, S., Zhang, X., Sun, Y., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., Su, D., Lv, J., Li, G., Zhang, Z., Zheng, L., Zhang, J. and Chen, B. (2015).** Transformation and Immobilization of Chromium by Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Revealed by SEM–EDS, TEM–EDS, and XAFS. *Environmental Science & Technology*, 49:14036-14047.

- Goransson, P., Olsson, P.A., Postma, J. and Falkengren-Grerup, U. (2008).** Colonisation by arbuscular mycorrhizal and fine endophytic fungi in four woodland grasses – variation in relation to pH and aluminium. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:2260-2265.
- Stiefel, E.I. (2002).** The biogeochemistry of molybdenum and tungsten. *Metals Ions in Biological System*, 39:1-29.
- Bambara, S. and Ndakidemi, P.A. (2010).** The potential roles of lime and molybdenum on the growth, nitrogen fixation and assimilation of metabolites in nodulated legume: A special reference to *Phaseolus vulgaris* L. *African Journal of Biotechnology*, 8(17):2482-2489.
- Schwarz G., Hagedoorn PL., Fischer K. (2007).** Molybdate and Tungstate: Uptake, Homeostasis, Cofactors, and Enzymes. In: Nies D.H., Silver S. (eds) *Molecular Microbiology of Heavy Metals. Microbiology Monographs*, vol 6. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bevers, L.E., Hagedoorn, P. and Hagen, W.R. (2009).** The bioinorganic chemistry of tungsten. *Coordination Chemistry reviews*, 253(3-4):269-290.
- Strigul, N., Koutsospyros, A., Christodoulatos, C. (2010).** Tungsten speciation and toxicity: Acute toxicity of mono- and poly- tungstates to fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73:164-171.
- Johnson, D.R. Inouye, L.S., Bednar, A.J., Clarke, J.U., Winfield, L.E., Boyd, R.E., Ang, C.Y. and Goss, J. (2009).** Tungsten bioavailability and toxicity in sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Land Contamination and Reclamation*, 17(1).
- Oburger, E., Cid, C.V., Preiner, J., Hu, J., Hann, S., Wanek, W. and Richter, A. (2018).** pH-Dependent Bioavailability, Speciation, and Phytotoxicity of Tungsten (W) in Soil Affect Growth and Molybdoenzyme Activity of Nodulated Soybeans. *Environmental Science and Technology*, 52:6146-6156.
- Garcia, K. and Zimmermann, S.D. (2014).** The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Frontiers in Plant Science*, 5, 337 pp.
- Smith, S.E., Smith, F.A. and Jakobsen, I. (2003).** Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. *Plant Physiology*, 133:16-20.
- Sieh, D., Watanabe, M., Devers, E.A., Brueckner, F., Hoefgen, R. and Krajinski, F. (2013).** The arbuscular mycorrhizal symbiosis influences sulfur starvation responses of *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 197:606-616.
- Giovannetti, M., Tolosano, M., Volpe, V., Kopriva, S. and Bonfante, P. (2014).** Identification and functional characterization of a sulfate transporter induced by both sulfur starvation and mycorrhiza formation in *Lotus japonicas*. *New Phytologist*, 204:609-619.



**Yao, Y., Sun, H., Xu, F., Zhang, X. and Liu, S. (2010).** Comparative proteome analysis of metabolic changes by low phosphorus stress in two *Brassica napus* genotypes. *Planta*, 233:523-537.

**Silva, A.M.D.S., Oliveira, E.C.A.D., Willadino, L.G., Freire, F.J. and Rocha, A.T.D. (2019).** Corrective phosphate application as a practice for reducing oxidative stress and increasing productivity in sugarcane. *Revista Ciência Agronômica*, 50(2), 188-196.

**Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L. and Polle, A. (2001).** Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiology*, 127(3):887-898.

**Kabata-Pendias, A. (2011).** Trace elements in soils and Plants – Fourth Edition. *CRC Press, Taylor and Francis Group Boca Raton, Fl*, 505 pp.



La précédente étude a révélé que l'inoculation de *Rhizophagus irregularis* (DAOM 197198) conduit à une colonisation rapide des systèmes racinaires d'espèces herbacées cultivées dans du laitier d'acier amendé avec du MIATE. De plus, le pH des pots inoculés avec Ri décroît significativement après 2 mois de culture par comparaison avec ceux non-inoculés : outre la preuve que l'interaction mycorhizienne a bien lieu, cela constitue un aspect d'intérêt pour la phytostabilisation des laitiers d'aciérie. En effet, sa forte alcalinité expose les plantes à une toxicité métallique ainsi qu'à une carence en nutriments. L'inoculation de Ri augmente l'acquisition des macroéléments P, K et S. Cependant, aucun effet n'a été descellé quant à l'accumulation de Cr ou d'Al lorsque l'AMF a été apporté. Des expériences supplémentaires doivent être menées pour évaluer la capacité des AMF à promouvoir la croissance des plantes et améliorer la résilience d'un couvert végétal dans le cadre d'un projet de phytostabilisation de laitiers. Cela peut passer par l'intermédiaire de cultures plus longues à l'échelle du site d'étude, mais également en employant des souches indigènes de micro-organismes prospectables *in situ*. En effet, à notre connaissance, il n'existe pas de consortium microbiens adaptés à la bioaugmentation dans le cadre de la phytostabilisation des décharges de laitiers. Dans ce contexte, le prochain chapitre a vocation à étudier la structuration de fonctions exprimées par des bactéries associées aux plantes, isolées *in situ* et susceptibles de promouvoir la croissance de plantes sur de tels substrats.

## **Chapitre 7: Characterization of plant-associated bacteria from an 8- years old phytostabilized technosoil**

**Mathieu Scattolin<sup>1\*</sup>, Petra Susan Kidd<sup>2</sup>, Stéphane Pfendler<sup>1</sup>, Olivier Faure<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Moulin, Univ Lumière, Univ Jean Monnet, ENTPE, INSA Lyon, ENS Lyon, CNRS, UMR 5600 EVS, UMR 5307 LGF, Centre SPIN, Département PEG, F - 42023 Saint-Etienne, France*

<sup>2</sup>*Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), CSIC, Apdo. 122, 15780 Santiago de Compostela, Spain*

*\*Corresponding author.*

*Mathieu Scattolin*

*Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Moulin, Univ Lumière, Univ Jean Monnet, ENTPE, INSA Lyon, ENS Lyon, CNRS, UMR 5600 EVS, UMR 5307 LGF, Centre SPIN, Département PEG, F - 42023 Saint-Etienne, France*

*Email: [mathieu.scattolin@mines-stetienne.fr](mailto:mathieu.scattolin@mines-stetienne.fr)*

**Article en préparation**

## Abstract

The ecological functions of bacteria (*e.g.* mineralization of organic matter, nitrogen cycle, soil aggregation, *etc.*) modify soil properties and elements availability. Beside their high metallic content, steel slags phytomanagement remain an important issue since those substrates exhibit severe edaphic constraints (low amounts of organic matter, high alkalinity, *etc.*). In that context, the use of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) would be of interest since they possess functional properties able to facilitate plants nutrition and development. This study aimed at characterizing the culturable plant-associated bacteria communities, especially the PGPB, isolated from a slag dump modified for phytoremediation purpose. Results showed strong genetic differences as well as contrasted PGP traits between strains isolated from *F. arundinacea* and *M. officinalis* rhizospheres: Organic acids and IAA synthesizing bacteria were mostly collected in *F. arundinacea* whereas siderophores producers and phosphate solubilizing ability were isolated in those of *M. officinalis*. The capacity to produce biosurfactants was encountered in both plant species. In addition, most of the functional traits were structured across two indicators of soil fertility: pH and CEC. Multivariate analysis and phenetic clustering method have enquired on soil properties to look for, in order to prospect specific PGP traits valuable for slag dumps phytoremediation.

## 1. Introduction

Bacteria colonize almost all types of support on the Earth, especially soils, in which they are a key component for this ecosystem (Nielsen and Winding, 2002; Carney and Matson, 2005; Giri *et al.*, 2005). Bacterial communities exhibit a wide diversity of metabolisms contributing to their essential ecological functions (Torsvik and Ovreas, 2002) and contribute to modify soil properties and elements availability (Buscot, 2005; Van Der Heijden *et al.*, 2008; Gadd, 2010). Consequently, they play a crucial role in pedogenesis (Rillig and Mummey, 2006; Pronk *et al.*, 2016) and plants nutrition (Barea *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2009; Jacoby *et al.*, 2017). Thus, bacteria are important drivers for plant development and ecological successions (He *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014; Markowicz *et al.*, 2015).

The understanding of soil bacterial communities and their roles is particularly important in the context of phytoremediation on technosoils. In fact, some microorganisms can decrease the phytoaccumulation of trace elements, through alleviating stress and induced toxicity, thereby

improving plant development on highly contaminated soils (Mishra *et al.*, 2017; Etesami, 2018; Saran *et al.*, 2020). This is highly valuable for phytostabilization approaches, whose goal is to stimulate the development of a self-sustainable plant cover on polluted sites, in order to limit pollutant release and transfer to the environment (Mendez and Maier, 2008; Vamerali *et al.*, 2010; Kidd *et al.*, 2015).

Due to their atypical properties, technosoils are generally supplied with amendments to improve plant growth. In fact, amendments lead to modify important proxies such as the substrate texture, the Cations Exchange Capacities (CEC) or to adjust the pH in order to reduce trace elements mobility (Melgar-Ramirez *et al.*, 2012; Novo *et al.*, 2013). It is also well known that organic as well as inorganic amendments modify the soil microbial communities (Perez-Piqueres *et al.*, 2006; Treonis *et al.*, 2010; Melgar-Ramirez *et al.*, 2012; Geisseler and Scow, 2014). Indeed, due to the bacterial high plasticity, communities can adapt to new conditions, such as toxic elements pollution. For instance, high concentrations in metal elements (*e.g.* Cd, Zn, Pb, Cr) is a drastic selective factor that can promote the emergence of metal tolerance for microorganisms evolving in (Giller *et al.*, 2009; Bélanger *et al.*, 2011).

In this study, we focused our attention on plant-associated bacteria communities, especially the Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB), isolated from a marginal substrate modified for phytoremediation purpose. Through their ecological roles (*e.g.* phytohormones synthesis, nitrogen fixation, phosphates solubilizing, biosurfactants production, ACC deaminase activity, *etc.*), PGPB possess functional properties able to facilitate plant growth, properties that can be helpful in the context of phytomanagement of polluted technosoils (Kidd *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2019; Saran *et al.*, 2020).

The present study site is a metallurgical dump located in Rive-de-Gier (France) characterized by extreme alkalinity (pH >10) and high amounts of various metals (*e.g.*, Al, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn, *etc.*). Since 2010, *in-situ* phytostabilization experiments were performed (Bouchardon *et al.*, 2010; Hattab *et al.*, 2014; Oustriere *et al.*, 2016) by testing various amendments (Ramial Chipped Wood (RCW), Composted Sewage Sludge (CSS) and Nitrogen (N), Phosphorus (P), Potassium (K) mineral fertilization (NPK)) and plant assemblages (regular, pseudo-metallophyte and without seeding). After eight years, the experimental studied areas showed contrasting plant covers, suggesting that different microorganisms communities could have adapt in various ways. The composition of bacterial communities is

often strongly influenced by soil pH (Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010, Bartram *et al.*, 2014) as well as organic matter content, nutrients and trace elements availability (Anderson, 2003; Zornoza *et al.*, 2010; Kuramae *et al.*, 2011) acting on CEC (Wang *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Tomasic *et al.*, 2013).

To further our study, we analyzed the agronomical parameters on the three amended soil (CSS, NPK and RCW). Then, we assessed the culturable bacteria communities associated with two plant species (*Festuca arundinacea* and *M. officinalis*) growing onto slag phytostabilization fields. Moreover, the functional traits of each of the pure cultured PGPB strains were evaluated. Finally, we identified and selected the PGPB that could be used for future phytostabilization purposes.

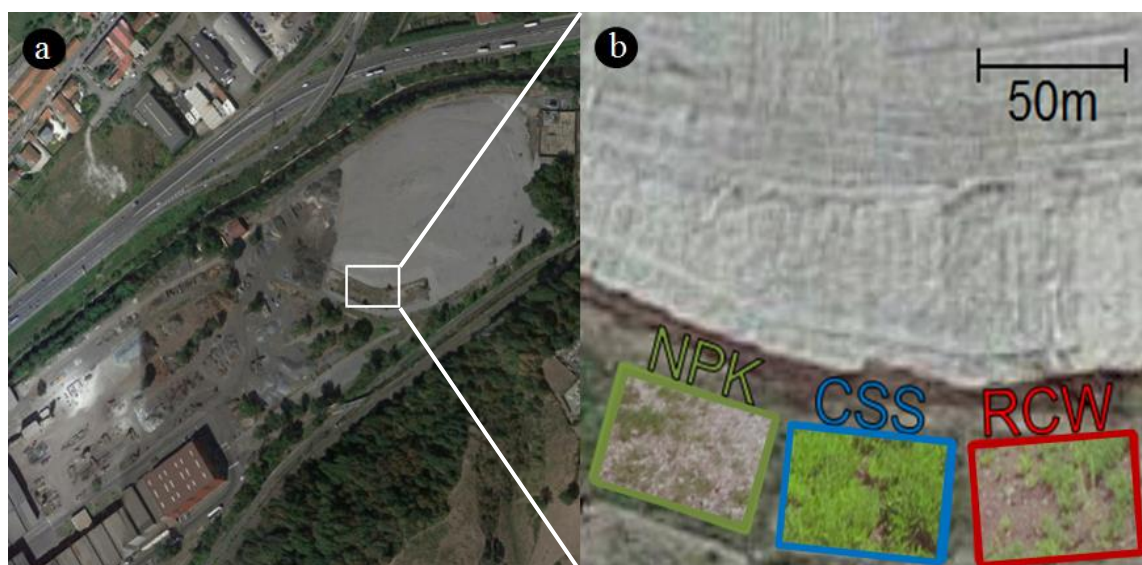
## 2. Material and methods

### 2.1. Site description

The study site, located in Rive-de-Gier (45°26' N, 4°17' E), is a steel slag landfill neighbor to the Industeel-France steelworks (Fig. 1a). The site contains approximately 500,000 T of an Electric Arc Furnace slag from Carbon steel production (EAF-C), spread over 5 ha. This material (pH <10) is mainly composed of silicates, aluminates, lime and metal oxides (Piatak *et al.*, 2016) as well as various metals in high concentrations (*e.g.* Cr (7584 ppm), Cu (708 ppm), Mn (6730 ppm), Mo (828 ppm), Pb (412 ppm), V (124 ppm), and Zn (623 ppm)). In 2014, phytostabilization experiments were performed on 9 parcels of 50 m<sup>2</sup> using three amendments (CCS, NPK and RCW) and three plants assemblage (Bouchardon *et al.*, 2010). The best vegetation cover (~95 %) was obtained by coupling the CSS amendment with pseudo-metallophyte plants. Regarding that plant assemblage, 2 plant species remained strongly present through the three differently amended parcels, 8 years after their sowing. In the present study, we have thus sampled rhizospheric soils of those plant species, *F. arundinacea* and *M. officinalis*, in 3 phytostabilized parcels amended with CSS, NPK and RCW.

## 2.2. Sampling and analysis of parcels substrate

The three slag phytostabilization parcels sown with the pseudo-metallophyte assemblage were selected to evaluate the effects of the three tested amendments (CSS, NPK and RCW) used during their implantation (Fig. 1b). For each parcel and plant species, 3 substrate replicates were randomly sampled. After sieving the samples at 2 mm, agronomic analyses were performed for the following parameters: pH (in water), Cation Exchange Capacity (CEC), Total Organic Carbon (TOC), total Nitrogen (N), total  $\text{CaCO}_3$ , active  $\text{CaCO}_3$ , exchangeable phosphorus, exchangeable potassium, magnesium, calcium, sodium, copper, zinc, manganese and iron.



**Figure 1:** Aerial view of the Industeel-France ArcelorMittal metallurgical landfill (a) and slag phytostabilization parcels amended with RCW, CSS and NPK in 2010 (b)

## 2.3. Isolation of the plant-associated bacteria

Isolation of rhizospheric soil bacteria was conducted using 5g of the <4 mm fraction of fresh soil. After adding 45 mL of sterile sodium hexametaphosphate solution (1 %), each sample was shaken for 30 min in an end-over-end shaker. Then, 5 mL of the supernatant were diluted in 10-fold series and plated onto 284 solid medium (Schlegel *et al.*, 1991). After 7 days incubation at 28 °C, the number of Colony Forming Units (CFU) of each morphological different isolate was counted. Those distinct colony morphotypes were purified among three sub-isolation steps and cryopreserved at -70 °C in 1/10 strength 869 medium supplemented with 15 % (v/v) glycerol. Isolated strains presenting more than  $10^5$  CFU  $\text{g}^{-1}$  of rhizospheric

soil were selected for molecular identification and the characterization of their functional traits.

#### *2.4. DNA extraction and amplification*

Purified strains were cultivated in 1/10 strength 869 liquid medium following the protocol of Mergeay (1985) protocol. Then, DNA was extracted by an alkaline cell lysis followed by a phenol/chloroform/isopropanol purification. DNA quality analyzes were performed by a migration on an electrophoresis gel (0.8 % agarose). PCR amplification targeting the 16S rRNA gene was carried out using the primers 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 16S-1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTA CGACTT-3') (Lane, 1991). PCR reactions were performed in a total volume of 50 µL containing: 1x Taq buffer (Invitrogen), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of each dNTP, 1.75U Taq polymerase (Invitrogen), 0.4 µM of each primer, and 1 µL of previously extracted DNA. DNA was amplified using following PCR steps: denaturation during 2 min at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C (annealing), 2 min at 72 °C (extension) and the final elongation during 10 min at 72 °C. PCR products were partially sequenced (750 to 1000 pb) using the same primers as the amplification step (Lane, 1991). The quality of the sequenced signal were controlled using the Chromas v. 1.45 software (Technelysium Pty. Ltd., Australia), uploaded, aligned in the Ribosomal Database Project (RDP, Cole *et al.*, 2009) and assessed for similarity with sequences in the RDP. The sequences used for identification of the cultivable strains are available in the EMBL database ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### *2.5. Characterization of the bacterial functional traits*

Characterization of the functional traits aims to document the mid-term natural response of microbial populations in relation to the study site forcing conditions. Moreover, it would be of interest for bioprospection purposes. All isolated bacteria strains were phenotypically characterized through Plant Growth Promoting (PGP) traits. Therefore, we carried out a qualitative determination of organic acids, siderophores, biosurfactants and indole-3-acetic acid (IAA) production as well as the bacterial ability to solubilize inorganic phosphates.



### *2.5.1. Solubilization of inorganic phosphates*

Phosphates solubilizing bacteria strains were detected using National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) (Nautiyal, 1999). Each strain was inoculated in two replicates and incubated at 28 °C for 5 days. The formation of a translucent halo around the bacterial colony indicated the dissolution of mineral phosphate, and consequently, the bacterial ability to solubilize inorganic phosphates.

### *2.5.2. Production of siderophore*

Siderophores-producing strains were qualitatively assayed in a 284 liquid medium (without Fe) using the Chrome-Azurol S reagent (CAS) as described by Schwyn and Neilands (1987) and adapted by Alexander and Zuberer (1991). The siderophores synthesized by the strain bind to iron from an Fe-CAS complex and the release of the CAS dye results in a color change (from blue to orange). After inoculation of tubes containing the 284 media and subsequent incubation at 28 °C for 7 days under agitation (150 rpm), cells were pelleted by centrifugation (2500 g for 10 min). Then, 100 µL of the supernatant were put in microwells and 100 µL of CAS reagent were added, in two replicates. After 2 hours, the change of color is considered as a positive result, indicating the presence of siderophores.

### *2.5.3. Ability to produce IAA*

The capacity of isolated strains to produce IAA was evaluated by colorimetric assay using Salkowski reagent, which upon reaction with IAA yields pink color (Patten and Glick, 2002). Bacterial auxin is produced by the metabolization of L-tryptophan. After inoculation of tubes containing a Sucrose-Minimal Salts (SMS) liquid medium supplemented with 0.5 mg mL<sup>-1</sup> of L-tryptophan (Sheng *et al.*, 2008) and subsequent incubation at 28 °C for 5 days (150 rpm), the bacterial suspensions were centrifuged (4000 g for 10 min). Then, 1 mL of supernatant was collected and mixed with 4 mL of Salkowski's reagent. After an incubation of 20 min at room temperature, absorbance at 530 nm was measured and IAA concentration was determined using a calibration curve of pure IAA (IAA standard was provided by Sigma, St. Louis, MO). The bacterial strains that produced more than 4 µg mL<sup>-1</sup> of IAA were considered positive.



#### 2.5.4. *Synthesis of biosurfactants*

Biosurfactants are amphiphilic surface-active metabolites. Individual strains ability to produce biosurfactants were determined qualitatively using the microplate assay developed by Cottingham *et al.* (2004). Individual strains were inoculated in 284 liquid medium and tubes were incubated at 28°C for 7 days (150 rpm). Cells were pelleted by centrifugation (2500 g for 10 min) and 100 µL of each strain supernatant was put into a microwell plate, in two replicates and disposed below a sheet of paper with a grid. The presence of biosurfactant was highlighted by an optical distortion change caused by surfactants in an aqueous solution, bringing the fluid surface concave.

#### 2.5.5. *Production of organic acids*

Organic acids producing bacteria were qualitatively assayed using a bromocresol purple enriched solid medium. Each strain was inoculated in two replicates on plate containing the medium and incubated at 28 °C for 5 days. The isolated strains ability to produce organic acids was evaluated by formation of a yellow halo around the bacterial colonies, indicating the medium pH has decreased.

#### 2.5.6. *Statistical analysis*

All statistical calculations and plot drawings were performed using R software (R core Team, 2017). The agronomic properties between the three amended parcels were compared using the Wilcoxon rank sum test, with Holm's p-adjust method for multiple comparisons. In order to reduce the number of quantitative variables for the following multivariate analysis, relationships between soils properties were explored by Spearman's rank correlation coefficients and associated p-values.

A Factorial Analysis of Mixed Data (FAMD), devoted to investigate potential linkage between qualitative (bacterial functional traits) and quantitative (soils properties) variables (Husson *et al.*, 2009), was performed. Subsequently, cluster analysis was used to confirm the factorial analysis results by grouping individual variables. Therefore, the nature of each obtained cluster was characterized by specific functions of bacterial isolates it contains in response to main soil parameters measured in the three parcels.

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of the NPK, CSS and RCW amended soils

The agronomic properties of the three amended parcels are presented in Table I. The pH of RCW amended slag was the highest ( $8.9 \pm 0.08$ ) in comparison to those of NPK and CSS ( $8.6 \pm 0.12$  and  $8.5 \pm 0.04$ , respectively). In addition, the RCW parcel also exhibited the highest MgO content ( $1.272 \pm 0.388 \text{ g.kg}^{-1}$ ). Moreover, the NPK amended plot had the lowest CEC of the parcels ( $4.8 \pm 0.4 \text{ cmol.kg}^{-1}$ ) as well as the lowest amounts of N, TOC and  $\text{K}_2\text{O}$  ( $0.8 \pm 0.2 \text{ g.kg}^{-1}$ ,  $16.4 \pm 2.1 \text{ g.kg}^{-1}$ ,  $0.091 \pm 0.011 \text{ g.kg}^{-1}$ , respectively). Conversely, the significantly higher CEC of RCW and CSS parcels were not significantly different ( $12.6 \pm 5.3$  and  $11.9 \pm 4.2 \text{ cmol.kg}^{-1}$ , respectively). Focusing on CSS amended parcel, it exhibited the highest  $\text{P}_2\text{O}_5$  content ( $0.233 \pm 0.070 \text{ g.kg}^{-1}$ , 8 times more than those of RCW and NPK) as well as the highest bioavailable Fe ( $27.0 \pm 5.4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). The Spearman correlations calculations performed on agronomic properties data set (Table II) showed that the pH was strongly and negatively correlated to N,  $\text{P}_2\text{O}_5$ , Fe and Mn amounts. Regarding CEC, it was highly and positively correlated to total  $\text{CaCO}_3$ , active  $\text{CaCO}_3$ , TOC,  $\text{K}_2\text{O}$ , CaO and MgO contents.

**Table I:** Agronomic properties of the amended slag parcels (n = 3 per parcel)

Category	Parameter	RCW	CSS	NPK
Physical	pH	$8.90 \pm 0.08$ (a)	$8.50 \pm 0.04$ (b)	$8.60 \pm 0.12$ (b)
	CEC ( $\text{cmol kg}^{-1}$ )	$12.6 \pm 5.3$ (a)	$11.9 \pm 4.2$ (a)	$4.8 \pm 0.4$ (b)
Fertility ( $\text{g kg}^{-1}$ )	N	$1.5 \pm 0.3$ (a)	$3.6 \pm 1.3$ (a)	$0.8 \pm 0.2$ (b)
	TOC	$28.0 \pm 2.8$ (a)	$37.6 \pm 15.0$ (a)	$16.4 \pm 2.1$ (b)
	Active $\text{CaCO}_3$	$34.3 \pm 13.5$ (a)	$16.7 \pm 2.5$ (b)	$11.7 \pm 1.7$ (b)
	Total $\text{CaCO}_3$	$149.0 \pm 86.2$ (a)	$46.3 \pm 8.2$ (b)	$36.7 \pm 8.6$ (b)
Exchangeable macronutrients ( $\text{g kg}^{-1}$ )	$\text{P}_2\text{O}_5$	$0.026 \pm 0.004$ (b)	$0.233 \pm 0.070$ (a)	$0.030 \pm 0.009$ (b)
	$\text{K}_2\text{O}$	$0.221 \pm 0.086$ (a)	$0.313 \pm 0.106$ (a)	$0.091 \pm 0.011$ (b)
	CaO	$9.73 \pm 0.83$ (a)	$9.63 \pm 0.96$ (a)	$7.72 \pm 0.45$ (a)
	MgO	$1.272 \pm 0.388$ (a)	$0.646 \pm 0.149$ (b)	$0.416 \pm 0.040$ (b)
	$\text{Na}_2\text{O}$	$0.016 \pm 0.004$ (b)	$0.031 \pm 0.011$ (a)	$0.016 \pm 0.001$ (b)
Bioavailable micronutrients ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Cu	$14.4 \pm 4.7$ (a)	$11.2 \pm 2.8$ (a)	$16.3 \pm 4.7$ (a)
	Zn	$75.4 \pm 7.9$ (a)	$44.8 \pm 22.2$ (b)	$35.6 \pm 10.9$ (b)
	Mn	$15.0 \pm 2.6$ (a)	$17.3 \pm 2.8$ (a)	$18.1 \pm 5.4$ (a)
	Fe	$9.0 \pm 0.7$ (b)	$27.0 \pm 5.4$ (a)	$13.6 \pm 2.6$ (b)

CEC: Cation-Exchange Capacity

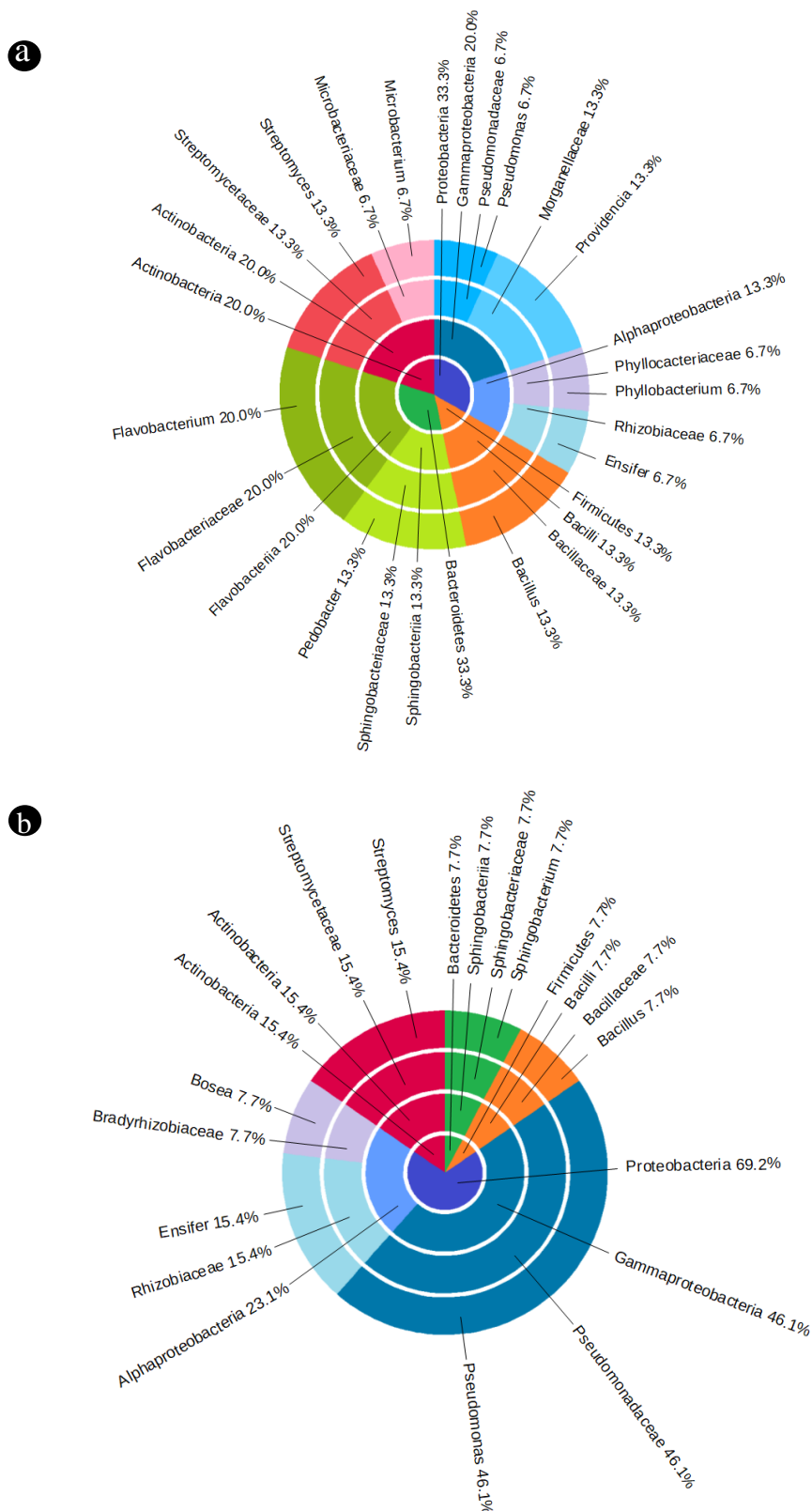
TOC: Total Organic Carbon

**Table II:** Spearman correlation coefficients ( $\rho$ ) between pH, CEC and soil properties of the amended slag parcels

	pH	CEC
N	-0.97	NS
TOC	NS	0.92
Active CaCO <sub>3</sub>	NS	0.85
Total CaCO <sub>3</sub>	NS	0.62
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-0.94	NS
K <sub>2</sub> O	NS	0.93
CaO	NS	0.95
MgO	NS	0.82
Na <sub>2</sub> O	NS	NS
Cu	NS	NS
Zn	NS	NS
Mn	-0.65	NS
Fe	-0.84	NS

### 3.2. Identification and phylogenetic analysis of culturable rhizospheres bacteria

In order to obtain pure cultures, we isolated all morphologically different colonies. A total of 15 and 13 culturable strains were respectively isolated in *F. arundinacea* and *M. officinalis* rhizospheres (Table III and IV). In the rhizospheric soils of *F. arundinacea*, the six following phyla (Fig. 2a) were found: *Actinobacteria* (3 strains), *Flavobacteria* (3 strains), *Sphingobacteria* (2 strains), *Bacilli* (2 strains), *Alpha-* (2 strains) and *Gammaproteobacteria* (3 strains). Bacterial community isolated from *M. officinalis* rhizospheric soils was composed of the same phyla than those from *F. arundinacea* (*Actinobacteria*: 2 strains; *Sphingobacteria*: 1 strain; *Bacilli*: 1 strain; *Alpha-*: 3 strains and *Gammaproteobacteria*: 6 strains) (Fig. 2b), in exception of the *Flavobacteria* that were absent. Thus, the strongest difference between both bacterial communities appeared in the number of members belonging to the *Proteobacteria* (69.2% isolated from *M. officinalis* rhizospheres compared to the 33.3% from *F. arundinacea* rhizospheres). Indeed, they differed especially by the *Gammaproteobacteria* class, representing 46.1% of *M. officinalis* isolates diversity compared to 20.0% in those of *F. arundinacea*.



**Figure 2:** Taxonomic breakdown of 16S rDNA gene sequences of culturable rhizospheric soil bacteria of *Festuca arundinacea* (a) and *Melilotus officinalis* (b) sampled in the phytostabilization parcels

### 3.3. Bacterial functional traits

The phenotypical characteristics of isolated strains differed between both plant species (Table III and IV). The most frequently encountered tested functions in strains associated with *F. arundinaceae* were the production of organic acid, IAA and biosurfactants (respectively 60.0%, 53.3% and 53.3% of the 15 isolates), while only one strain (*Pseudomonas koreensis* MN421299) was able to solubilize phosphates. Finally, none of the tested bacterial strains were siderophore producers. At the opposite, the most frequent PGP traits exhibited by the *M. officinalis*-associated strains were the ability of solubilizing phosphates, excreting biosurfactants and siderophores (respectively 53.8%, 53.8% and 46.2% of the 13 isolates). However, *M. officinalis* isolated strains were not able to produce IAA and only one strain was able to produce organic acids (*Pseudomonas costantini* MN421413).

### 3.4. Statistical analyzes of functional traits

Regarding the soil properties, the multivariate analysis was focused on pH and CEC: Those parameters constitute efficient and integrative indicators of the soil fertility. In addition, most of the soil characteristics were showed to co-vary with these both factors (Table II).

**Table III:** Functional diversity of rhizospheric soil bacteria isolated from *Festuca arundinacea* collected in amended slag parcels, with accession number of identified strains

Identified bacteria	Parcel	Organic acid producer	Phosphate solubilizer	IAA producer <sup>a</sup>	Siderophore producer	Biosurfactant producer	CFU g <sup>-1</sup>
<i>Festuca arundinacea</i>							
<i>Bacillus licheniformis</i> MN421232	RCW	+	-	+	-	-	1.8 x 10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> MN421231	RCW	+	-	+	-	-	4.0 x 10 <sup>6</sup>
<i>Microbacterium thalassium</i> MN421235	RCW	+	-	+	-	-	9.8 x 10 <sup>5</sup>
<i>Streptomyces misionensis</i> MN421234	RCW	-	-	+	-	-	1.9 x 10 <sup>6</sup>
<i>Ensifer Numidicus</i> MN421281	CSS	-	-	-	-	+	6.9 x 10 <sup>6</sup>
<i>Flavobacterium pectinovorum</i> MN421274	CSS	-	-	-	-	+	2.0 x 10 <sup>6</sup>
<i>Flavobacterium pectinovorum</i> MN421275	CSS	+	-	-	-	+	1.5 x 10 <sup>6</sup>
<i>Flavobacterium pectinovorum</i> MN421277	CSS	+	-	-	-	-	8.0 x 10 <sup>6</sup>
<i>Providencia heimbachae</i> MN421278	CSS	-	-	-	-	+	9.5 x 10 <sup>6</sup>
<i>Providencia rettgeri</i> MN421276	CSS	+	-	-	-	+	3.3 x 10 <sup>6</sup>
<i>Streptomyces alboflavus</i> MN421279	CSS	-	-	-	-	+	7.7 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pedobacter ginsenosidimutans</i> MN421300	NPK	+	-	+	-	+	5.1 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pedobacter ginsenosidimutans</i> MN421301	NPK	+	-	+	-	-	2.5 x 10 <sup>6</sup>
<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> MN421298	NPK	+	-	+	-	+	4.0 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas koreensis</i> MN421299	NPK	-	+	+	-	-	3.0 x 10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup>Were considered positive the strains producing more than 4 µg mL<sup>-1</sup> of IAA

**Table IV:** Functional diversity of rhizospheric soil bacteria isolated from *Melilotus officinalis* collected in amended slag parcels, with accession number of identified strains

Identified bacteria	Parcel	Organic acid producer	Phosphate solubilizer	IAA producer <sup>a</sup>	Siderophore producer	Biosurfactant producer	CFU g <sup>-1</sup>
<i>Melilotus officinalis</i>							
<i>Pseudomonas costantini</i> MN421413	RCW	+	+	-	-	+	1.9 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas helmanticensis</i> MN421415	RCW	-	+	-	+	+	1.3 x 10 <sup>6</sup>
<i>Streptomyces alboflavus</i> MN421417	RCW	-	-	-	-	-	1.9 x 10 <sup>6</sup>
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> MN421414	RCW	-	-	-	-	-	3.2 x 10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus Toyonensis</i> MN421435	CSS	-	-	-	-	+	1.4 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas helmanticensis</i> MN421433	CSS	-	-	-	-	-	4.4 x 10 <sup>6</sup>
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> MN421436	CSS	-	-	-	-	-	1.5 x 10 <sup>6</sup>
<i>Bosea lathyri</i> MN421153	NPK	-	-	-	+	+	2.6 x 10 <sup>6</sup>
<i>Ensifer Numidicus</i> MN421166	NPK	-	+	-	+	-	3.8 x 10 <sup>6</sup>
<i>Ensifer Numidicus</i> MN421167	NPK	-	+	-	+	+	3.2 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas congelans</i> MN421149	NPK	-	+	-	+	-	1.9 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas koreensis</i> MN421148	NPK	-	+	-	-	+	2.8 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas koreensis</i> MN421164	NPK	-	+	-	+	+	2.6 x 10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup>Were considered positive the strains producing more than 4 µg mL<sup>-1</sup> of IAA

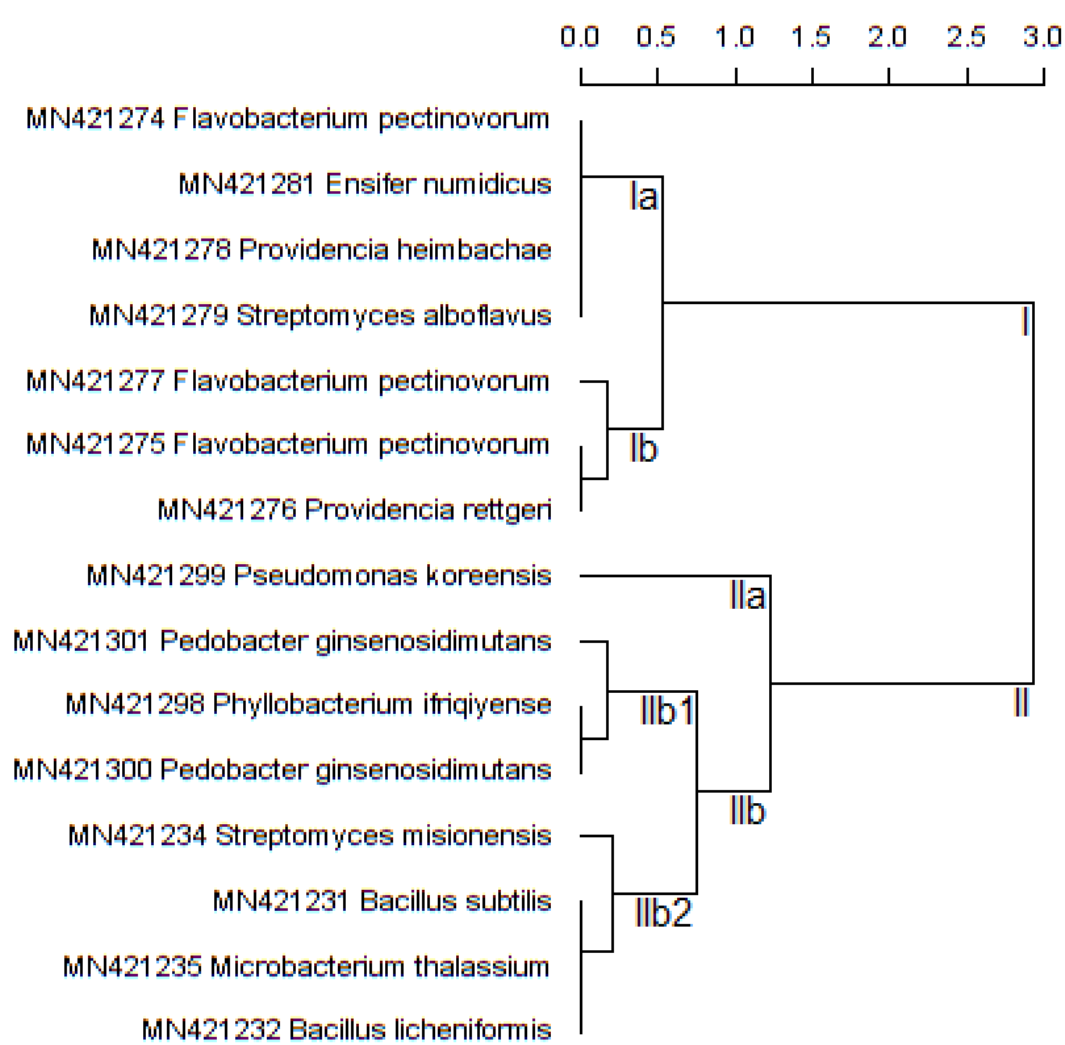
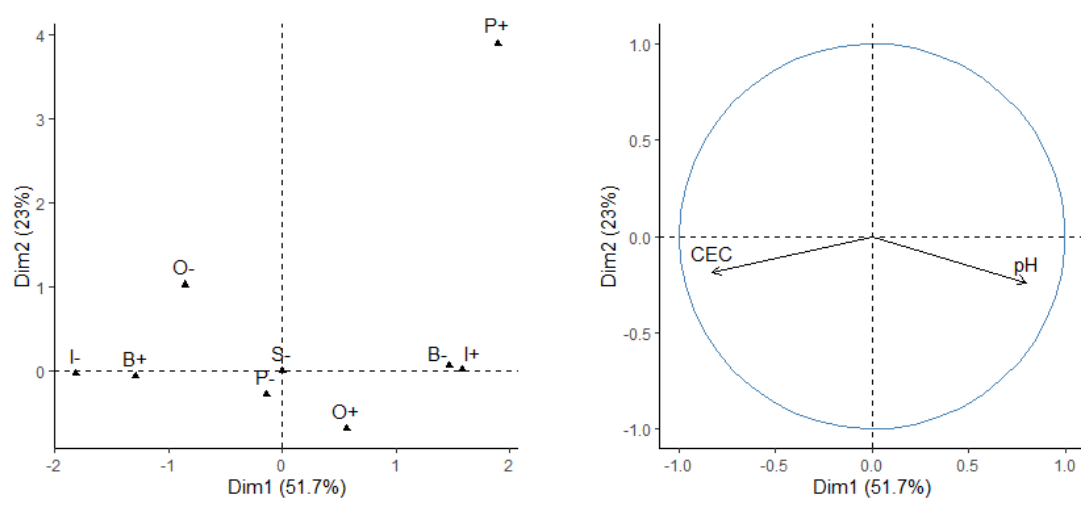
### 3.4.1. Bacterial traits of *F. arundinacea*

Figure 3 shows the results obtained after statistical analysis (FAMD), of the *F. arundinacea* rhizospheric bacterial functional traits (Fig. 3a) related to pH and CEC of the parcels they originated (Fig. 3b). The first axis caught 51.7% of data variance and their major loadings were the pH, the CEC, and the production of IAA and biosurfactants. The second axis accounted for 23.0% of total variance and appeared structured by phosphates solubilizing trait occurrence.

The phenogram (Fig. 3c) with associated groups of *F. arundinacea* isolates PGP traits and soil attributes was first divided in two groups, noted I and II. Group I was characterized by significantly higher CEC and lower pH in comparison with the group II.

The group I gathered 75.0% of biosurfactants producing strains and was subdivided in both Ia and Ib groups. Ia associated the significantly highest CEC individuals and comprised 66.6% of the strains unable to produce organic acids. Conversely, strains belonging to the group Ib were all able to secrete organic acids and were isolated in the lowest CEC conditions. The group II had significantly lower CEC, higher pH in comparison to the Group I, and gathered all the IAA producing strains. The subdivided group IIa corresponded to the unique phosphates solubilizing strain isolated in *F. arundinaceae* rhizosphere (*Pseudomonas koreensis* MN421299), while the IIb contained 87.5% of IAA producing strains isolated. Among the IIb group, IIb1 comprised the lowest CEC individuals and IIb2 congregated the most alkaline conditions and 57.0% of strains unable to produce biosurfactants.





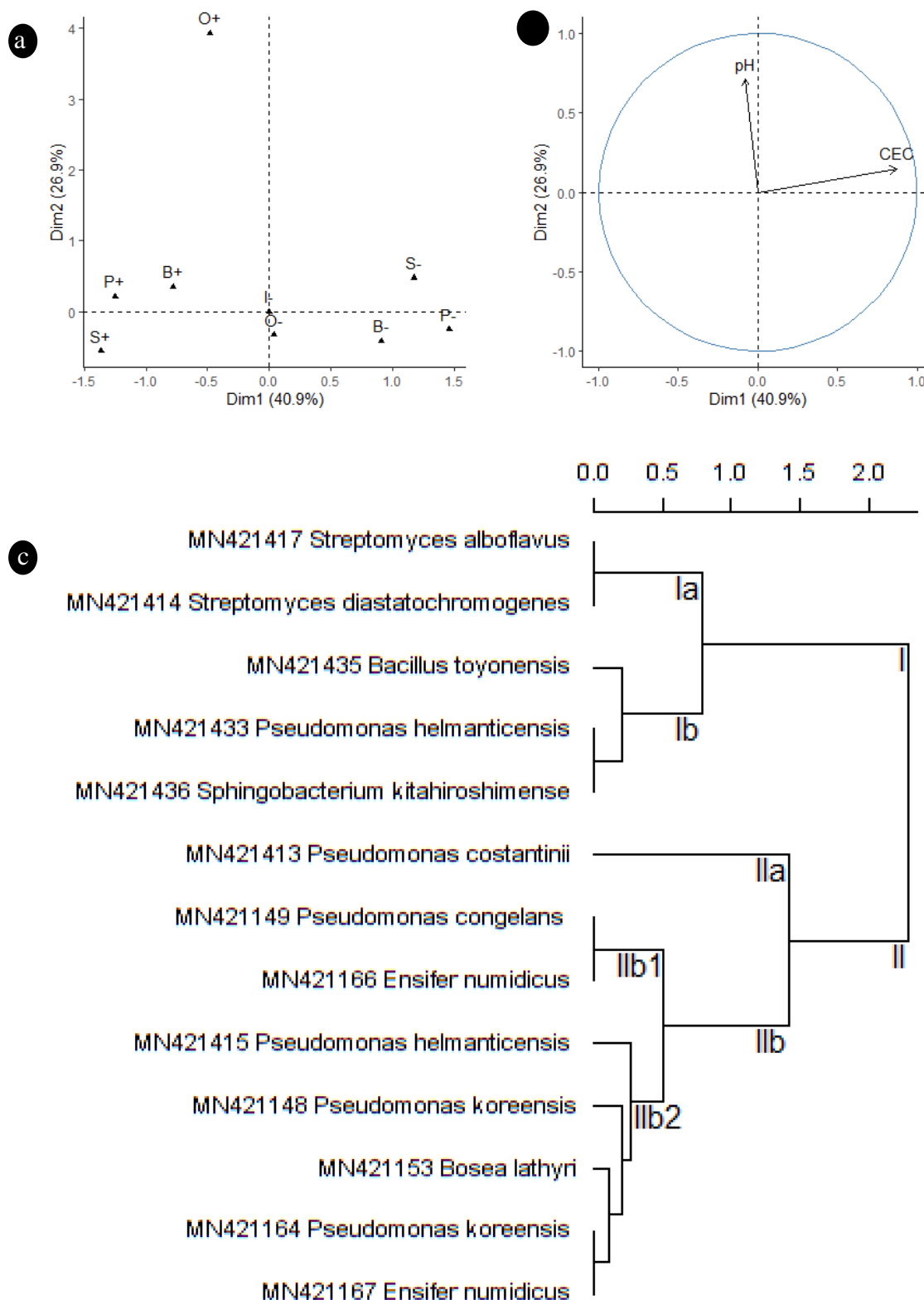
s (O : Organic acid ; P : Phosphate solubilizer ; I : IAA ; S : Siderophores ; B : Biosurfactants) (a) related to isolation parcel pH and CEC (b) and corresponding hierarchical clustering (c)

### 3.4.2. Bacterial traits of *M. officinalis*

The FAMD analyze shown in Figure 4 was processed on PGP traits of individual isolates associated with *M. officinalis* rhizospheres (Fig. 4a) and related to the pH and CEC (Fig. 4b). The first axis was mainly driven by the CEC, biosurfactants, siderophores, phosphates solubilizing traits, and accounted for 40,9% of total variance. The FAMD second axis caught 26.9% of data variance and was structured by the pH and the occurrence of organic acids excreting trait.

As well as the *F. arundinacea* phenogram (Fig. 3c), the *M. officinalis* FAMD analyzes (Fig. 4c) permitted to separate the isolated strains into two groups (noted I and II). Bacterial strains of the group I were isolated in significantly higher soils CEC conditions than those belonging to the group II.

The group I gathered 83.3% of the strains unable to solubilize phosphates and 71.4% of the strains unable to produce siderophores. The subgroup Ia contained the highest pH conditions, while the Ib comprises the lowest soils pH and the highest CEC. However, no significant PGP trait was preferentially encountered in each of these groups. In opposition, the group II contained all phosphates solubilizing and siderophores producing strains. Subdivided group IIa gathered an unique strain that was able to produce organic acids (*Pseudomonas costantini* MN421413). Group IIb corresponded to the significantly lowest CEC, gathered all the strains able to produce siderophores and 85.7% of the strains able to solubilize phosphates. Both strains congregated in the group IIb1 were shown to be siderophores excretors and able to solubilize phosphates. Comparatively, IIb2 was characterized by 71.4% of all biosurfactants producing strains collected from *M. officinalis* rhizospheres.



**Figure 4:** FAMD processed on individual isolates of Melilots rhizosphere: functional traits (O : Organic acid ; P : Phosphate solubilizer ; I : IAA ; S : Siderophores ; B : Biosurfactants) (a) related to isolation parcel pH and CEC (b) and corresponding hierarchical clustering (c)

## 4. Discussion

### 4.1. Edaphic constraints of the amended slag parcels

The studied phytostabilization plots, albeit colonized by vegetation introduced, exhibited atypical soil properties. For instance, NPK and RCW parcels presented high C/N ratios, which is a characteristic feature of soils exhibiting a very low capacity to mineralize organic matter (Khalil *et al.*, 2005; Watts *et al.*, 2010; Ostrowska and Porebska, 2015). By contrast, CSS parcel appeared the most favorable to balance humification and mineralization of organic matter processes, exhibiting as expected the highest TOC, N and P contents.

RCW amended parcel showed the most alkaline conditions of the field plots, thus classifying it as one of the few soils in the world with a pH above 8.5 (Fierer and Jackson, 2006). Indeed, the negative correlations between pH and N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Fe and Mn are consistent with our previous study (Scattolin *et al.*, 2020) showing that the main edaphic constraint hampering plants growth and survival is the pH of the slag. Indeed, slag extreme alkalinity limits the availability of macro- and micronutrients such as P, Mn and Zn and therefore their uptake. Furthermore, it is well known that alkaline soils strongly affect bacterial communities, through loss of richness, diversity and biomass (Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010).

NPK parcel was characterized by the lowest CEC of the three amended plots. This indicator depends of water retention capacity and is consequently highly correlated to substrate texture and organic carbon concentration (Adenyian *et al.* 2011; Tomasic *et al.*, 2013). Indeed, organic matter and clays have a large number of negative charges on their surface. Sandy and highly mineral soils generally present a low CEC and are thus subjected to leaching (Waswa *et al.*, 2013). This is in accordance with the positive correlations observed between CEC and TOC, K<sub>2</sub>O, CaO and MgO contents of sampled substrates. In fact, our results showed that organic amendments (CSS or RCW) significantly increased the substrate CEC due to organic matter they supply (Wang *et al.*, 2005; Adenyian *et al.*, 2011).

Soil pH, moisture and organic carbon supply are the main factors structuring the soil microbial communities (Griffiths *et al.*, 2001; Lauber *et al.*, 2009). Thus, the pH and the CEC would constitute efficient factors to investigate functional distributions across the three differently amended phytostabilization fields.

#### 4.2. Bacterial communities associated with *F. arundinacea* and *M. officinalis*

Our study focused on the most abundant and cultivable strains ( $> 10^5$  CFU g<sup>-1</sup>) isolated from rhizospheric soils of *F. arundinacea* and *M. officinalis*. The sequenced bacterial strains belonged to phylotypes widely encountered in contaminated (e.g. *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*) (Golebiewski *et al.*, 2014; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018) and in a large variety of uncontaminated soils (e.g. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Sphingobacterium*, *Flavobacterium*) (Janssen, 2006). Moreover, isolated strains sequencing results were consistent with the work of Luo *et al.* (2018) that was carried out on a 5 years old revegetation project implemented on smelting slag. Furthermore, both *Proteobacteria* and *Actinobacteria* phyla were recorded in high proportion in plant rhizosphere. This result is not surprising since these phyla are well known to inhabit under alkaline pH condition (Rousk *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2013; Yun *et al.*, 2016). Indeed, proteobacterial group was predominant in soils exhibiting large amounts of available C (Fierer *et al.*, 2007). Rousk *et al.* (2010) have hypothesized that high pH, through increasing plant-C input, would enhance C availability for associated bacteria.

Plant species and their functional types are well-known to affect their associated bacteria (Nannipieri *et al.*, 2007; Eisenhauer *et al.*, 2010; Marschner *et al.*, 2011). In fact, both rhizospheric soil and associated bacteria are affected by root activity and exudates, which depend on many specific characteristics (e.g. plant nutritional status, respiration rate, N concentration, *etc.*) (Roumet *et al.*, 2008; Jacoby *et al.*, 2017). Moreover for plant-associated bacteria communities, plant diversity and their roots exudates influence at least as much as soils properties they originate from (Stephan *et al.*, 2000; Kuske *et al.*, 2002; Marschner *et al.*, 2001, 2004). For instance, Parish *et al.* (2005) have compared the effects of *F. arundinacea* and *M. officinalis* rhizospheres and degrader bacterial populations they host for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons dissipation and found significant differences between both planted treatments. Furthermore, the well-known association of N<sub>2</sub>-fixing bacteria with *Fabaceae* species enhances N availability in the vicinity of those plants rhizospheres, therefore change the abundance of bacteria involved in the soil N cycle (Terpolilli *et al.*, 2012; Scavo *et al.*, 2020). Thus, it is not surprising that bacterial communities isolated from *F. arundinacea* (*Poaceae*) and *M. officinalis* (*Fabaceae*) be different.

The main difference between the bacterial communities of both plant species was the high proportion of strains belonging to the *Pseudomonas* genera isolated from *M. officinalis* rhizospheres. This genus has been described as one of the most effective PGP rhizobacteria for its capacity to produce siderophores (Dey *et al.*, 2004), solubilize phosphates (Wu *et al.*, 2005) as well as to be used as biocontrol agent (Wahyudi and Astuti, 2011). Another difference in both plant bacterial communities resides in the higher percentage of *Rhizobiaceae* isolated on *M. officinalis* rhizospheres in comparison to those of *F. arundinacea*. Indeed, *M. officinalis* is a *Fabaceae* species that develops symbiosis with diazotrophic bacteria, thus explaining the higher percent of *Rhizobiaceae* (e.g. *Ensifer*, *Bosea*).

#### 4.3. Bacterial functional attributes and their link with parcels pH and CEC

The functional attributes of isolated rhizospheric bacteria communities were sharply different between both plant species (Fig. 4 and 5). Indeed, the diversity of host-associated microorganisms have been demonstrated to be part of extended phenotype of the host (Whitham *et al.*, 2003; Zilber-Rosenberg *et al.*, 2008; Partida-Martinez *et al.*, 2011) as consequences to affect its fitness and evolution (Kembell *et al.*, 2014). Consequently, differences in functional traits between *F. arundinacea* and *M. officinalis* associated bacteria are relevant with genetic varieties observed comparing both bacterial communities (Fig. 2 and 3).

Functional traits of *F. arundinacea* associated bacteria were related to pH and CEC of each parcel. Firstly, biosurfactants production was associated with the highest CEC and the lowest pH. These soil conditions corresponded to the highest amounts of organic matter, micro- and macro-nutrients bioavailability. Indeed, *F. arundinacea* has already been screened for its ability to facilitate phytoremediation of petroleum contaminated site, notably through the occurrence of root-associated bacteria able to produce biosurfactants (Liu *et al.*, 2014). Haba *et al.* (2000) also showed that the production of biosurfactants by a *Pseudomonas* strain was greater in higher level of N supplied, which is consistent with our results. Consequently, we can hypothesize that *F. arundinacea* plants have selected biosurfactants producers to alleviate the deleterious effects of trace elements (Gnanamani *et al.*, 2010) or to enhance micronutrients uptake (Singh *et al.*, 2018).

Secondly, the production of IAA was associated with the lowest CEC and the highest pH of parcels. Moreover, the poor availability of organic matter and micro- and macro-nutrients limit plant growth on slag even in the CSS-amended soil (Scattolin *et al.*, 2020). In these stressful

conditions, plants could require extra-supply of phytohormones in order to alleviate that edaphic constraint. Finally, although rarely present in the isolated *F. arundinaceae* associated bacteria, the ability to solubilize phosphates was related to the most alkaline soil condition (RCW). In fact, it is known that calcareous and alkaline soils favor the formation of calcium phosphates minerals (Hopkins and Ellsworth, 2005)

The PGP traits of *M. officinalis*-associated bacteria were sharply different from those isolated from *F. arundinaceae*. The FAMD coupling the occurrence of those traits with soils properties was primarily linked to CEC. Thus, most of the strains unable to solubilize phosphates and to produce siderophores were isolated from the parcels exhibiting the highest CEC (RCW and CSS). Since these associated bacteria were not selected for their capacity to enhance the plant nutrition, this suggests that *M. officinalis* grown in those soils were not subject to P or micro-nutrients deficiencies. Conversely, most of the bacteria able to solubilize phosphates and to produce siderophores originated from the lowest soil CEC. They were indeed mainly isolated from NPK amended plot, which has very low amounts of TOC, N and bioavailable K, P, Fe and Zn. These results are in accordance with Carvalhais *et al.* (2013) who investigated the impact of maize roots exudates, submitted to various nutrient deficiencies, on the transcriptome of a beneficial bacteria. They evidenced that bacterial genes implied in N-, P- and Fe- starvations were plant-exudates regulated. In addition, Castrillo *et al.* (2017) also showed that plants phosphate starvation response involves rhizosphere bacteria to overcome low P availability. All the *Rhizobia* members were collected from NPK plot, which exhibited the lower amount of N. In such conditions, *M. officinalis* seemed to favor the selection of diazotrophic PGPB (Whiting *et al.*, 2001; Glick, 2003).

This current study revealed structuration of the functional traits of plants-associated bacteria across the pH and the CEC of the parcels. The pH was already noticed to strongly influence soil bacterial assemblages (Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010) since it drives the availability of soils nutrients. pH values were negatively correlated to P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, N and Mn contents in the present study parcels. In addition, bacterial communities are also highly dependent of organic matter amounts and moisture of the substrate (Anderson, 2003; Zornoza *et al.*, 2010; Kuramae *et al.*, 2011). This was verified through the CEC values which were highly and positively correlated to TOC, but also to K<sub>2</sub>O. Besides the substrate TOC, K availability could also be responsible of the association between CEC and bacteria functional traits analyzed, as already shown by Perreira *et al.* (2014) and Saxena *et al.* (2015).

Among the 28 characterized strains of this study, only *Pseudomonas costantini* MN421413 (isolated from RCW), was able to produce organic acids and solubilize phosphates. However, it is generally admitted that the key mechanism of phosphates solubilizing bacteria is linked to their capacity to decrease the pH of the growth medium by releasing organic acids (Shen *et al.*, 2006). On the hand, some studies did not obtain significant relationship between phosphate solubilization capacity and pH decrease (Zhao *et al.*, 2003; Rashid *et al.*, 2004) and particularly in highly alkaline conditions (Nautiyal *et al.*, 2000). In addition, Marra *et al.* (2015) have also pointed out that initial pH of the growth medium for organic acids screening influences these compounds production rates. Moreover, Johri *et al.* (1999) have suggested that in alkaline conditions, Ca would play a crucial role in the dissolution of phosphate rocks by microorganisms. These contrasted reports suggest that further studies have to be performed in order to screen efficiently organic acids producing bacteria originating from alkaline environments.

#### 4.4. Valuable PGP traits for steel slag phytomanagement

In order to improve steel slag phytomanagement, the understanding of bacterial functional attributes such as biosurfactants, IAA, siderophores producing or phosphates solubilizing would be of high interest.

In fact, biosurfactant produced by some bacteria (*e.g.* *Bacillus* MTCC 5514) permit to reduce Cr(VI) to Cr(III) and subsequently trap the resulting Cr(III) in micelles (Gnanamani *et al.*, 2010). Moreover, biosurfactants favor Cu adsorption to the roots and reduce its translocation to aboveground biomass of a salt marsh plant (Almeida *et al.*, 2009). As well as biosurfactant, IAA-synthesizing activity has beneficial properties by stimulating plant growth and increasing various metabolites in plants tissues (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Hryniewicz and Baum, 2011). However, many opportunistic bacteria strategies are based on their ability to synthesize IAA, revealing the long term co-evolutionary processes that occurred in plant-microbes interactions (Jameson, 2000; Spaepen *et al.*, 2007). Thus, in order to avoid the introduction of phytopathogens in phytomanagement operations, IAA producing isolates necessitate further characterizations before to be employed.



Concerning the bacterial traits enhancing plants nutrition, the beneficial association between plants and phosphate-solubilizing bacteria for the phytomanagement of metalliferous soils have already been reported to be efficient for overcoming the P deficiency in soils or the metal stress exerted on plants (Khan *et al.*, 2013; Ahemad and Kibret, 2014; Ahemad, 2015; Gupta and Kumar, 2017). In addition, benefits of using siderophores-producing bacteria have already been screened to enhance metal accumulation in phytoextraction projects (Braud *et al.*, 2009; Rajkumar *et al.*, 2010; Kidd *et al.*, 2017). However, inoculating PGPB synthesizing siderophores may also be useful in phytostabilization context since it increases Fe uptake, which therefore could reduce the noxious effects of trace metals as Ni, Pb and Zn (Burd *et al.*, 2000). Moreover, some siderophores appeared able to chelate Zn and Cd and subsequently decrease their uptake by plants (Kuffner *et al.*, 2008). Finally, Dimpka *et al.* (2008) have shown that siderophores application to cowpea plants lowered the formation of free radicals and enhance chlorophyll content, which would be relevant to enhance the sustainability of a vegetation cover exposed to high metal concentrations.

## 5. Conclusions

The characterization of *F. arundinacea* and *M. officinalis* associated bacteria from 8 years old slag phytostabilization study fields revealed communities structuration across two indicators of soil fertility: pH and CEC. Those both factors are indeed symptomatic of the severe edaphic constraints acting as selective pressure in slag parcels: NPK exhibited very low organic matter and macro-nutrients contents and RCW was mainly devoid of P and Fe, but CSS exhibited the most favorable properties for plants growth. Those contrasted soil properties have emerged preferential PGP attributes for each plant species. Organic acids and IAA synthesizing bacteria were mostly collected in *F. arundinacea* rhizospheres whereas siderophores producers and phosphate solubilizing ability were isolated in those of *M. officinalis*. The capacity to produce biosurfactants was encountered in both plant species. Genetic characterization informed on prevalent bacteria phyla and classes installed in those particular soils: Besides some differences between both plant species due to their functional groups (*Poaceae* and *Fabaceae*), many isolated phyla were already encountered in alkaline soil (e.g. *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria*). The multivariate analysis and phenetic clustering method have enquired on soil properties to look for, in order to prospect specific PGP traits valuable for slag dumps phytostabilization: All the functional attributes analyzed would indeed potentially promote plant growth and survival in these extreme conditions. The strains

*Pedobacter ginsenosidimutans* MN421300, *Pseudomonas costantini* MN421413, *Pseudomonas helmanticensis* MN421415, *Ensifer Numidicus* MN421167 and *Pseudomonas koreensis* MN421164 could constitute good candidates since they exhibited three of the five PGP traits tested. Further experiments have to be assessed in order to test the viability of those strains as inoculates to promote plants growth in slag phytomanagements projects.

## References

- Nielsen, M.N. and Winding, A. (2002). Microorganisms as indicators of soil health. *National Environmental research Institute, Denmark*, Technical Report No.388.
- Carney, K.M. and Matson, P.A. (2005). Plant communities, soil microorganisms, and soil carbon cycling: Does altering the world belowground matter to ecosystem functioning? *Ecosystems*, 8:928-940.
- Giri, B., Giang, P.H., Kumari, R., Prasad, R. and Varma, A. (2005). Microbial diversity in soils. In: Varma A., Buscot F. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Soil biology, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg*, pp. 19-55.
- Buscot, F. (2005). What are soils? In: Varma A., Buscot F. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Soil biology, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg*, pp. 3–18.
- Van Der Heijden, M.G.A, Bardgett, R.D. and Van Straalen, N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and production in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 11:296-310.
- Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156:609-643.
- Rillig, M.C. and Mummey, D.L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New phytologist*, 171:41-53.
- Pronk, G.J., Heister, K., Vogel, C., Babin, D., Bachmann, J., Ding, G.C., Ditterich, F., Gerzabek, M.H., Giebler, J., Hemkemeyer, M., Kandeler, E., Mouvenchery, Y.K., Miltner, A., Poll, C., Schaumann, G.E., Smalla, K., Steinbach, A., Tanuwidjaja, I., Tebbe, C.C., Wick, L.Y., Woche, S.K., Totsche, K.U., Schlöter, M. and Kögel-Knaber, I. (2016). Interaction of minerals, organic matter, and microorganisms during biochemical interface formation as shown by a series of artificial soil experiments. *Biology and Fertility of Soils*, 53:9-22.
- Barea, J.M., Azcon, R. and Azcon-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Varma A., Buscot F. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Soil biology, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg*, pp. 195-212.
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M. and Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321:305-339.

- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A. and Kopriva, S. (2017).** The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition – Current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 8:1617.
- He, X.Y., Wang, K.L., Wei, Z., Chen, Z.H., Zhu, Y.G. and Chen, H.S. (2008).** Positive correlation between soil bacteria metabolic and plant species diversity and bacterial and fungal diversity in a vegetation succession on Karst. *Plant Soil*, 307:123-134.
- Li, Y., Wen, H., Chen, L. and Yin, T. (2014).** Succession of bacterial community structure and diversity in soil along a chronosequence of reclamation on coal mine spoils in China. *PLoS ONE*, 9:12.
- Markowicz, A., Wozniak, G., Borymski, S., Piotrowska-Seget, Z. and Chmura, D. (2015).** Links in the functional diversity between soil microorganisms and plant communities during natural succession in coal mine spoil heaps. *Ecological Research*, 30:1005-1014.
- Melgar-Ramirez, R., Gonzalez, V., Sanchez, J.A. and Garcia, I. (2012).** Effects of application of organic and inorganic wastes for restoration of sulfur-mine soil. *Water Air Soil Pollution*, 223:6123:6131.
- Novo, L.A.B., Covelo, E.F. and Gonzalez, L. (2013).** The potential of *Salvia verbenaca* for phytoremediation of copper mine tailings amended with technosol and compost. *Water Air Soil Pollution*, 224:1513.
- Bouchardon J.L., Faure O., Lespagnol G., Moutte J., Guy B., Mimoun D., Graillet D., Paran F., Croze V., Athenol, J.D., Ferrando B., Boisson J., Perret S., Hitmi A., Verney P., Moussard Gauthier C., Ledoigt G., Goupil P., Sac C. and Mench M. (2014).** Physafimm: La phytostabilisation, méthodologie applicable aux friches industrielles, métallurgiques et minières. *Rapport final, convention ADEME n° 0872C0119, ADEME Ed.*, 158 pp.
- Scattolin, M., Peuble, S., Pereira, F., Paran, F., Moutte, J., Menad, N., & Faure, O. (2020).** Aided-phytostabilization of steel slag dumps: The key-role of pH adjustment in decreasing chromium toxicity and improving manganese, phosphorus and zinc phytoavailability. *Journal of Hazardous Materials*, 124225.
- Bolan, N.S. and Duraisamy, V.P. (2003).** Role of inorganic and organic soil amendments on immobilization and phytoavailability of heavy metals: a review involving specific case studies. *Australian Journal of Soil Research*, 41:533-555.
- Kim, K.R., Owens, G., Naldu, R. and Kim, K.H. (2007).** Assessment techniques of heavy metal bioavailability in soil – A critical review. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 40(4):311-325.

- Adeniyi, O.N., Ojo, A.O., Akinbode, O.A. and Adediran, J.A. (2011).** Comparative study of different organic manures and NPK fertilizer for improvement of soil chemical properties and dry matter yield of maize in two different soils. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 2(1):9-13.
- Waswa, B.S., Vlek, P.L.G., Tamene, L.D., Okoth, P., Mbakaya, D. and Zingore, S. (2013).** Evaluating indicators of land degradation in smallholder farming systems of western Kenya. *Geoderma*, 195-196:192-200.
- Chintala, R., Mollinedo, J., Schumacher, T.E., Malo, D.D. and Julson, J.L. (2014).** Effect of biochar on chemical properties of acidic soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(3):393-404.
- Zornoza, R., Acosta, J.A., Martinez-Martinez, S., Faz, A. and Baath, E. (2015).** Main factors controlling microbial community structure and function after reclamation of a tailing pond with aided phytostabilization. *Geoderma*, 245-246:1-10.
- Perez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V.E., Alabouvette, C. and Steinberg, C. (2006).** Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:460-470.
- Treonis, A.M., Austin, E., Buyer, J.S., Maul, J.E., Spicer, L., Zasada, I.A. (2010).** Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Applied Soil Ecology*, 46:103-110.
- Geisseler, D. and Scow, K.M. (2014).** Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 75:54-63.
- Winding, A., Hund-Rinke, K. and Rutgers, M. (2005).** The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and environmental safety*, 62:230-248.
- Sørensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. and Wuertz S. (2005).** Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3:700-710.
- Harrison, E. and Brockhurst, M.A. (2012).** Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends in microbiology*, 20:262-267.
- Giller, K.E., Witter, E. and McGrath, S.P. (2009).** Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:2031-2037.
- Bélanger, P.A., Beaudin, J. and Roy, S. (2011).** High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. *Journal of Microbiological Methods*, 85:92-97.

- Grandlic, C.J., Palmer, M.W. and Maier, R.M. (2009).** Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization. of mine tailings. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1734-1740.
- Kidd, P.S., Alvarez-Lopez, V., Becerra-Castro, C., Cabello-Conejo, M. and Prieto-Fernandez, A. (2017).** Potential Role of Plant-Associated Bacteria in Plant Metal Uptake and Implications in Phytotechnologies. *Advances in Botanical Research*, 83:87-126.
- Khan, A., Singh, J., Upadhyay, V.K., Singh, A.V. and Shah, S. (2019).** Microbial Biofortification: A green technology through plant growth promoting microorganisms. *In: Shah S., Venkatramanan V., Prasad R. (eds) Sustainable Green Technologies for Environmental Management. Springer, Singapore*, pp. 255-269.
- Saran, A., Imperato, V., Fernandez, L., Gkorezis, P., Haen, J., Merini, L.J., Vangronsveld, J. and Thijs, S. (2020).** Phytostabilization of polluted military soil supported by bioaugmentation with PGP-trace element tolerant bacteria isolated from *Helianthus petiolaris*. *Agronomy*, 10:204.
- Chai, L., Huang, S., Yang, Z., Peng, B. Huang, Y. and Chen, Y. (2009).** Cr (VI) remediation by indigenous bacteria in soils contaminated by chromium-containing slag. *Journal of Hazardous Materials*, 167:516-522.
- Azcón, R., del Carmen Perálvarez, M., Roldán, A. and Barea, J.M. (2010).** Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a Multicontaminated Soil Alleviate Metal Toxicity in Plants. *Microbial ecology*, 59:668-677.
- Milošević Nada, A., Marinković Jelena, B. and Tintor Branislava, B. (2012).** Mitigating abiotic stress in crop plants by microorganisms. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 123:17-26.
- Mishra, J., Singh, R. and Arora, N.K. (2017).** Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 8:1706.
- Etesami, H. and Maheshwari, D.K. (2018).** Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156:225-246.
- Mendez, M.O. and Maier, R.M. (2008).** Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments - An Emerging Remediation Technology. *Environmental health perspectives*, 116:278-283.
- Vamerali, T., Bandiera, M. and Mosca, G. (2010).** Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8:1-17.

- Kidd, P., Mench, M., Alvarez-Lopez, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Muller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J. and Puschenreiter, M. (2015).** Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*, 17:11.
- Hattab, N., Soubrand, M., Guégan, R., Motelica-Heino, M., Bourrat, X., Faure, O. and Bouchardon, J. L. (2014).** Effect of organic amendments on the mobility of trace elements in phytoremediated techno-soils: role of the humic substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:10470-10480.
- Oustriere, N., Marchand, L., Bouchardon, J. L., Faure, O., Moutte, J. and Mench, M. (2016).** Aided phytostabilization of a trace element-contaminated technosol developed on steel mill wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 320:458-468.
- Lauber, C.L., hammady, M., Knight, R. and Fierer, N. (2009).** Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15):5111-5120.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R. and Fierer, N. (2010).** Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4:1340-1351.
- Smith, J.L., Barrett, J.E., Tusnady, G., Rejto, L. and Cary, S.C. (2010).** Resolving environmental drivers of microbial community structure in Antarctic soils. *Antarctic Science*, 22(6):673-680.
- Bartram, A.K., Jiang, X., Lynch, M.D., Masella, A.P., Nicol, G.W., Dushoff, J. and Neufeld, J. (2014).** Exploring links between pH and bacterial community composition in soils from the Craibstone Experimental Farm. *FEMS Microbiology Ecology*, 87:403-415.
- Anderson, T.H. (2003).** Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 98:285-293.
- Kuramae, E., Gamper, H., Van Veen, J. and Kowalchuk, G. (2011).** Soil and plant factors driving the community of soil-borne microorganisms across chronosequences of secondary succession of chalk grasslands with a neutral pH. *FEMS Microbial Ecology*, 77:285-294.
- Wang, Q., Li, Y. and Klassen, W. (2005).** Determination of Cation Exchange Capacity on Low to Highly Calcareous Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36:1479-1498.
- Tomasic, M., Zgorelec, Z., Jurisic, A. and Kisic, I. (2013).** Cation Exchange Capacity of Dominant Soil Types in the Republic of Croatia. *Journal of Central European Agriculture*, 14(3):84-89.



- Piatak, N. M., Parsons, M. B. and Seal, R. R. (2015).** Characteristics and environmental aspects of slag: a review. *Applied Geochemistry*, 57:236-266.
- Schlegel, H.G, Cosson, J.P and Baker, A.J.M. (1991).** Nickel-hyperaccumulating plants provide a niche for nickel-resistant bacteria. *Botanica Acta*, 104:18-25.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H., Gerits, J., Charles, P. and Van Gijsegem F (1985).** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162:328-334.
- Lane D (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England, 115:175.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. (2009).** The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37:141-145.
- Nautiyal, C.S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Letters*, 170:265-270.
- Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal of Biochemistry*, 160:47-56.
- Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. (1991).** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12:39-45.
- Patten, C.L., and Glick, B.R. (2002).** Role of *Pseudomonas putida* Indole acetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3795-3801.
- Rahman, A., Sitepu, I.R., Tang, S.Y. and Hashidoko, Y. (2010).** Salkowski's Reagent Test as a Primary Screening Index for Functionalities of Rhizobacteria Isolated from Wild Dipterocarp Saplings Growing Naturally on Medium-Strongly Acidic Tropical Peat Soil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(11):2202-2208.
- Sheng, X.F., Xia, J.J., Jiang, C.Y., He, L.Y. and Qian, M. (2008).** Characterization of heavy metal resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*, 156:1164-1170
- Cottingham, M.G., Bain, C.D. and Vaux, J.T. (2004).** Rapid method for measurement of surface tension in multiwell plates, *Laboratory Investigation*, 84:523-529.
- Boruvka, L., Vacek, O., Jehlicka, J. (2005).** Principal component analysis as a tool to indicate the origin of potentially toxic elements in soils. *Geoderma*, 128:289–300.



- Sharma, M., Mishra, V., Rau ,N., RSH, S. (2011a).** Functionally diverse rhizobacteria of *Saccharum munja* (a native wild grass) colonizing abandoned morrum mine in Aravalli hills (Delhi). *Plant Soil*, 341:447–459.
- Guerrero-Zúñiga, A.L., López-López, E., Rodríguez-Tovar, A.V. and Rodríguez-Dorantes, A. (2019).** Functional Diversity of Plant Endophytes and Their Role in Assisted Phytoremediation. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*, 237:255.
- François Husson, Sébastien Lê et Jérôme Pagès (2009).** Analyse des données avec R, *Presses Universitaires de Rennes*, 224 pp.
- Khalil, M.I., Hossain M.B. and Schimidhalter, U. (2005).** Carbon and nitrogen mineralization in different upland soils of the subtropics treated with organic materials. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:1507-1518.
- Watts, D.B., Torbert, H.A. and Prior, S.A. (2010).** Long-Term Tillage and Poultry Litter Impacts Soil Carbon and Nitrogen Mineralization and Fertility. *Soil Fertility and Plant Nutrition*, 74(4)
- Ostrowska, A. and Porebska, G. (2015).** Assessment of the C/N ratio as an indicator of the decomposability of organic matter in forest soils. *Ecological Indicators*, 49:104-109.
- Griffiths, B.S., Monkowski, M., Roy, S. and Ritz, K. (2001).** Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology*, 16(1):49-61.
- Janssen, P.H. (2006).** Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3):1719-1728.
- Luo, Y., Wu, Y., Wang, H., Xing, R., Zheng, Z., Qiu, J., Yang, L. (2018).** Bacterial community structure and diversity responses to the direct revegetation of an artisanal zinc smelting slag after 5 years. *Environmental Science and Pollution Research*, 25:14773-14788.
- Shen, C., Xiong, J., Zhang, H., Feng, Y., Lin, X., Li, X., Liang, W. and Chu, H. (2013).** Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biology and Biochemistry*, 57:204-211.
- Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y. and Engel, A.S. (2016).** The Relationship between pH and Bacterial Communities in a Single Karst Ecosystem and Its Implicationor Soil Acidification. *Frontiers in Microbiology*, 7(1955).
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Giacomo, P., Renella, G. and Valori, F. (2007).** Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ciencia del suelo*, 25:89-97.

- Marschner, P., Crowley, D. and Rengel, Z. (2011).** Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis - model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 43:883-894.
- Eisenhauer, N., Hebler, H., Engels, C., Gleixner, G., Habekost, M., Milcu, A., Partsch, S., Sabais, A.C.W., Scherber, C., Weiglet, A., Weisser, W.W. and Scheu, S. (2010).** Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology*, 91(2):485-496.
- Roumet, C., Lafont, F., Sari, M., Warembourg, F. and Garnier, E. (2008).** Root traits and taxonomic affiliation of nine herbaceous species grown in glasshouse conditions. *Plant Soil*, 312:69-83.
- Stephan, A., Meyer, A.H. and Schmid, B. (2000).** Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. *Journal of Ecology*, 88:988-998.
- Kuske, C.R., Ticknor, L.O., Miller, M.E, Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, S.M. and Belnap, J. (2002).** Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in an Arid Grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1854.
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R., and Crowley, D.E. (2001).** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1437-1445.
- Marschner, P., Crowley, D.E. and Yang, C.H. (2004).** Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261:199-208.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. and Chauhan, S.M. (2004).** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 159(4):371-394.
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., Wong, M.H. (2005).** Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1-2):155-166.
- Wahyudi, A.T. and Astuti, R.I. (2011).** Screening of *Pseudomonas* sp. Isolated from Rhizosphere of Soybean Plant as Plant Growth Promoter and Biocontrol Agent. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(1):134-141.
- Terpolilli, J.J., Hood, G.A. and Poole, P.S. (2012).** What Determines the Efficiency of N<sub>2</sub>-fixing Rhizobium-Legume Symbioses ? *Advances in Microbial Physiology*, 60:325-389.

- Scavo, A., Restuccia, A., Lombardo, S., Fontanazza, S., Abbate, C., Pandino, G., Anastasi, U., Onofri, A. and Mauromicale, G. (2020).** Improving soil health, weed management and nitrogen dynamics by *Trifolium subterraneum* cover cropping, *Agronomy for Sustainable Development*, 40:18.
- Whitham, T.G., Young, W.P., Martinsen, G.D., Gehring, C.A., Schweitzer, J.A., Shuster, S.M., Wimp, G.M., Fischer, D.G., Bailey, J.K., Lindroth, R.L., Woolbright, S. and Kuske, C.R. (2003).** Community and Ecosystem Genetics: A Consequence of the Extended Phenotype. *Ecology*, 84(3):559-573.
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. (2008).** Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32:723-735.
- Partida-Martinez, L.P. and Heil, M. (2011).** The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science*, 2:100.
- Kembell, S.W., O'Connor, T.K., Arnold, H.K., Hubell, S.P., Wright, S.J. and Green, J.L. (2014).** Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *PNAS*, 111(38): 13715-13720.
- Liu, W., Hou, J., Wang, Q., Yang, H., Luo, Y. and Christie, P. (2014).** Collection and analysis of root exudates of *Festuca arundinacea* L. and their role in facilitating the phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Plant Soil*, 389:109-119.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. and Manresa, A. (2000).** Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3):379-387.
- Gnanamani, A., Kavitha, V., Radhakrishnan, N., Rajakumar, G.S., Sekaran, G. and Mandal, A.B. (2010).** Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2):334-339.
- Singh, R., Glick, B.R., Rathore, D. (2018).** Biosurfactants as a Biological Tool to Increase Micronutrient Availability in Soil: A Review. *Pedosphere*, 28(2):170-189.
- Hopkins, B. and Ellsworth, J. (2005).** Phosphorus availability with alkaline/calcareous soil. *Western Nutrient Management Conference, Salt Lake City, UT*, 6.
- Carvalhais, L.C., Dennis, P.G., Fan, B., Fedoseyenko, D., Kierul, K., Becker, A., Von Wiren, N. and Borriss, R. (2013).** Linking Plant Nutritional Status to Plant-Microbe Interactions. *PLOS ONE*, 8(7).

- Castrillo, G., Teixeira, P.J.P.L. Paredes, S.H., Law, T.F., De Lorenzo, L., Feltcher, M.E., Finkel, O.M., Breakfield, N.W., Mieczkowski, P., Jones, C.D., Paz-Ares, J. and Dangel, J.L. (2017).** Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature*, 543, 513-518.
- Whiting, S.N., de Souza, M.P. and Terry, N. (2001).** Rhizosphere Bacteria Mobilize Zn for Hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science and Technology*, 35:3144-3150.
- Glick, B.R. (2003)** – Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21:383-393.
- Perreira, L.B., Vicentini, R., Ottoboni, L.M.M. (2014).** Changes in the Bacterial Community of Soil from a Neutral Mine Drainage Channel. *PLOS ONE*, 9(5).
- Saxena, G., Marzinelli, E.M., Naing, N.N., He, Z., Liang, Y., Tom, L., Mitra, S., Ping, H., Joshi, U.M., Reuben, S., Mynampati, K.C., Mishra, S., Umashankar, S., Zhou, J., Andersen, G.L., Kjelleberg, S. and Swarup, S. (2015).** Ecogenomics Reveals Metals and Land-Use Pressures on Microbial Communities in the Waterways of a Megacity. *Environmental Science and Technology*, 49:1462-1471.
- Lozupone, C.A. and Knight, R. (2007).** Global patterns in bacterial diversity. *PNAS USA*, 104:11436-11440.
- Shen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. and Young, C.C. (2006).** Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34:33-41.
- Zhao, X., Lin, Q. and Li, B. (2003).** The relationship between rock phosphate solubilization and pH and organic acid production of microorganisms. *Journal of Microbiology*, 23:5-7.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Iatif, F. (2004).** Organic Acids Production and Phosphates Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) Under in vitro Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2):187-196.
- Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verma, D. (2000)** – Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182:291-296.
- Marra, L.M., Oliveira-Longatti, S.M., Soares, C.R.F.S., Lima, J.M., Olivares, F.L., Moreira, F.M.S. (2015).** Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2):367-375.
- Johri, J.K., Surange, S. and Nautiyal, C.S. (1999).** Occurrence of Salt, pH, and Temperature-tolerant, Phosphate-solubilizing Bacteria in Alkaline Soils. *Current Microbiology*, 39:89-93.

- Almeida, C.M.R., Dias, A.C., Mucha, A.P., Bordalo, A.A. and Vasconcelos, M.T.S.D. (2009).** Influence of surfactants on the Cu phytoremediation potential of a salt marsh plant. *Chemosphere*, 75:135-140.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2011).** Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10.1101/cshperspect.a001438
- Hryniewicz, K. and Baum, C. (2011).** The Potential of Rhizosphere Microorganisms to Promote the Plant Growth in Disturbed Soils. *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development*, 35-64.
- Jameson, P.E. (2000)** – Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. *Plant Growth Regulation*, 32:369-380.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31:425-448.
- Khan, M.S., Ahmad, E., Zaidi, A. and Oves, M. (2013).** Functional Aspect of Phosphate-Solubilizing Bacteria: Importance in Crop Production. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop productivity*, 237:263.
- Ahemad, M. and Kibret, M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Jouranl of King Saud University - Science*, 26:1-20.
- Ahemad, M. (2015).** Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. *Biotechnology*, 5:11-121.
- Gupta, P. and Kumar, V. (2017).** Value added phytoremediation of metal stressed soils using phosphate solubilizing microbial consortium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33:9.
- Braud, A., Jezequel, K., Bazot, S. and Lebeau, T. (2009).** Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere*, 74:280-286.
- Rajkumar, M., Noriharu, A., Prasad, M.N.V. and Freitas, H. (2010).** Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28:142-149.
- Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R. (2000).** Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 46:237-245.
- Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M. and Sessitsch, A. (2008).** Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil*, 304:35-44.

**Dimpka, C., Svatos, A., Merten, D., Buchel, G. and Kothe, E. (2008).** Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 54:163-172.

La précédente étude révèle une structuration des communautés bactériennes associées aux plantes dans les parcelles de phytostabilisation du site d'étude, issues du programme PHYSAFIMM. Deux indicateurs de la fertilité du sol peuvent permettre la bioprospection efficace de fonctions bactériennes employables dans des projets de phytostabilisation de dépôts de laitiers: le pH et la CEC. De ces propriétés du sol ont émergés des fonctions préférentielles chez les bactéries associées à chacune des deux espèces de plantes étudiées. Les souches productrices d'acides organiques et d'IAA ont essentiellement été collectées dans les rhizosphères de Fétuques tandis que celles capables de solubiliser les phosphates et de synthétiser des sidérophores ont surtout été isolées dans celles des Mélilots. La capacité de production de biosurfactants s'est retrouvée dans les 2 espèces végétales. Des expériences supplémentaires doivent être conduites afin de tester la viabilité de ces souches comme bioamendements dans des projets de phytostabilisation de dépôts de laitier sidérurgique.

## Conclusion générale

Les résultats de l'étude menée au chapitre 5 montrent que le pH est en fait un facteur clé pour le succès ou l'échec de l'implémentation d'une phytostabilisation sur décharge de laitier sidérurgique. Quand le pH du substrat est au-dessus de 8,6, la croissance des plantes et leur développement sont sévèrement restreintes. Ceci est à la fois dû à la toxicité du Cr(VI), induisant des dommages oxydatifs, et à une carence en Mn, Zn et P, qui sont des éléments essentiels étroitement liés aux défenses antioxydatives et au métabolisme énergétique des plantes. A l'inverse, une baisse du pH en dessous de 8,6 modifie la spéciation chimique de la plupart des éléments, conduisant à une diminution du Cr(VI) phytodisponible, conjointement à une augmentation du Mn, Zn et P phytodisponible. Ainsi, la mobilité et la toxicité du Cr(VI) sont amoindries, et le statut nutritif des plantes est amélioré, favorisant une croissance efficace. Conséquemment, lors de la mise en œuvre d'un projet de phytostabilisation à l'échelle d'un terrier de laitier sidérurgique, une attention particulière doit être apportée au contrôle du pH du sol avant le semis des graines, cela doit permettre de prédire comment la couverture végétale s'installera et survivra, tout en atténuant la mobilité du Cr(VI) et son transfert.

L'étude présentée dans le chapitre 6 a révélé que l'inoculation de *Rhizophagus irregularis* (DAOM 197198) conduit à une colonisation rapide des systèmes racinaires d'espèces herbacées cultivées dans du laitier d'acier amendé avec du MIATE. De plus, le pH des pots inoculés avec Ri décroît significativement après 2 mois de culture par comparaison avec ceux non-inoculés : outre la preuve que l'interaction mycorhizienne a bien lieu, cela constitue un aspect d'intérêt pour la phytostabilisation de laitier sidérurgique. En effet, sa forte alcalinité expose les plantes à une toxicité métallique ainsi qu'à une carence en nutriments. L'inoculation de Ri augmente l'acquisition des macroéléments P, K et S. Cependant, aucun effet n'a été descellé quant à l'accumulation de Cr ou d'Al lorsque l'AMF a été apporté. Dans le contexte de notre étude, l'inoculation conduit à une hausse de la phytodisponibilité du Mo et W, suggérant que cette souche pourrait se révéler intéressante pour la récupération biologique de ces éléments. Des expériences supplémentaires doivent être menées pour évaluer la capacité des AMF à promouvoir la croissance des plantes lors d'un projet de phytostabilisation de laitier sidérurgique, et notamment en employant des souches indigènes prospectables *in situ*. Accorder une importance particulière au contrôle du pH du laitier avant l'ensemencement pourrait également permettre d'identifier des tendances plus fines quant aux effets de l'AMF sur la nutrition des plantes.



Les résultats de l'étude présentée dans le chapitre 7 révèlent une structuration des communautés bactériennes associées aux plantes dans des parcelles de phytostabilisation de laitier selon 2 indicateurs de la fertilité du sol: le pH et la CEC. Ces facteurs sont en fait révélateurs des sévères contraintes édaphiques agissant comme pressions sélectives sur les parcelles : celle amendée par du NPK présentent des teneurs très faibles en matière organique et en macroéléments, celle ayant reçu du BRF est essentiellement dépourvue de P et Fe, l'apport de MIATE a quant à lui conduit aux propriétés les plus favorables pour le développement des plantes. De ces propriétés du sol contrastées ont émergés des traits fonctionnels préférentiels pour chacune des 2 espèces de plantes. Les souches productrices d'acides organiques et d'IAA ont essentiellement été collectées dans les rhizosphères de Fétuques tandis que celles capables de solubiliser les phosphates et de synthétiser des sidérophores ont surtout été isolées dans celles des Mélilots. La capacité de production de biosurfactants s'est retrouvée dans les 2 espèces végétales. La caractérisation génétique a informé de la prévalence des phyla et des classes installées dans ces sols particuliers : Outre les différences observées entre chaque espèce de plante, dues à leurs groupes fonctionnels distincts (*Poaceae* et *Fabaceae*), plusieurs phyla ont déjà été isolés dans des sols alcalins (e.g. *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* et *Actinobacteria*). La méthode par analyse multivariée couplée à la construction de l'arbre phénétique a renseigné sur les propriétés du sol à rechercher afin de prospector des PGPB potentiellement utiles pour la phytostabilisation de décharge de laitier : Tous les traits fonctionnels analysés sont en effet susceptibles de promouvoir la croissance et la survie des plantes dans ces conditions extrêmes. En cela, les souches *Pedobacter ginsenosidimutans* MN421300, *Pseudomonas costantini* MN421413, *Pseudomonas helmanticensis* MN421415, *Ensifer Numidicus* MN421167 et *Pseudomonas koreensis* MN421164 peuvent constituer de bons candidats car ils présentent 3 des 5 traits étudiés. Des expériences supplémentaires doivent être conduites afin de tester la viabilité de ces souches comme bioamendements dans des projets de phytostabilisation de laitier sidérurgique.

L'implémentation d'une phytostabilisation pour la gestion des dépôts de laitiers d'acier constitue un véritable défi. La capacité avérée de ces procédés pour réduire les flux de contaminants vers les environnements adjacents est fortement dépendante de l'efficacité avec laquelle le substrat est colonisé par les végétaux. L'installation durable d'un couvert végétal sur les technosols tels que les laitiers sidérurgiques nécessite l'initiation d'une pédogenèse favorable à son développement et à sa résilience. L'utilisation de MIATE en tant qu'amendement constitue en cela une approche prometteuse. En dehors du fait qu'il confère au

substrat la capacité de retenir l'eau tout en apportant les éléments nutritifs et la matière organique indispensable au développement des plantes, il permet d'ajuster le pH dans une gamme limitant la mobilité des éléments métalliques potentiellement toxiques, tout en améliorant celle des macro et des microéléments essentiels. Concrètement, un apport de MIATE à hauteur de 120 T/ha sur l'ensemble du terroir d'étude devrait permettre d'abaisser le pH du substrat en dessous de la valeur seuil de 8,6. Si un abaissement suffisant du pH n'est pas observé en différents points, il convient de réapporter du MIATE jusqu'à son obtention. Dès lors, un semis d'espèces « pseudo-métallophytes », calcicoles et tolérantes à la sécheresse peut être envisagé. Lorsque la gamme de pH favorable est atteinte ( $< 8,6$ ), l'inoculation de la souche d'AMF *R. irregularis* (DAOM197198) au moment du semis permet d'améliorer la nutrition des plantes rapidement après leur implantation, notamment en abaissant d'autant plus le pH du substrat que par apport de MIATE seul. A l'échelle du site d'étude, l'inoculation de cette souche très disponible peut permettre d'améliorer la colonisation végétale du laitier amendé, la pérennité du couvert ainsi que sa reprise d'une année à l'autre. La bioprospection de PGPB sur les parcelles de phytostabilisation implantées sur le site d'étude a conduit à l'identification de souches potentiellement utiles pour la conduite de projets de végétalisation de décharges de laitiers d'acier. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les dynamiques biogéochimiques ayant cours dans ces substrats marginaux, particulièrement en se penchant sur les différents aspects sur lesquels le pH intervient, afin de maximiser les chances d'initiation de pédogénèse et de mise en œuvre d'une phytostabilisation sur dépôts de laitiers d'acier.

## Perspectives

Une étude préliminaire d'évaluation de différents traitements de bioaugmentation *in situ* a été réalisée sur le site d'étude. Outre la mise en pratique des aspects opérationnels mis en évidence dans cette thèse, cette culture avait vocation à tester certaines souches bactériennes isolées dans le chapitre 7 comme bioamendments, pour une comparaison avec l'inoculation de *R. irregularis*, et les effets d'une co-inoculation. Après amendement d'une parcelle de laitier provenant du terril sidérurgique d'IFAM avec du MIATE en quantité requise ( $120\text{T.ha}^{-1}$ ) (Figure 13), s'en est suivi un contrôle du pH du substrat afin qu'il n'excède pas la valeur seuil de 8,6. Les espèces végétales et la densité de semis utilisées sont celles ayant été sélectionnées pour réaliser les études présentées dans les chapitres 5 et 6.

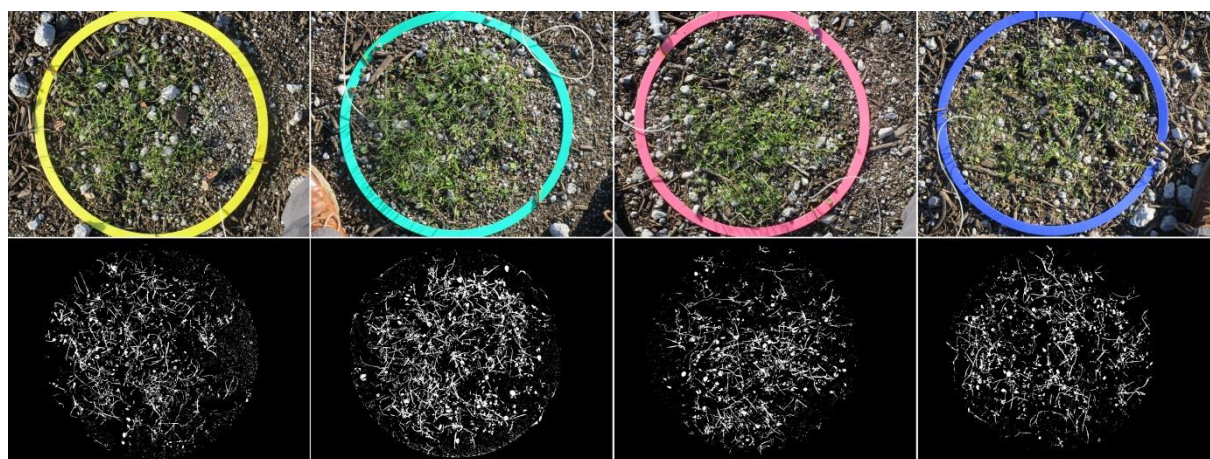


**Figure 13 :** État de la parcelle expérimentale amendée de MIATE ( $120\text{ T.ha}^{-1}$ ) (a) 1 mois après le semis (b) et 6 mois après le semis (c)

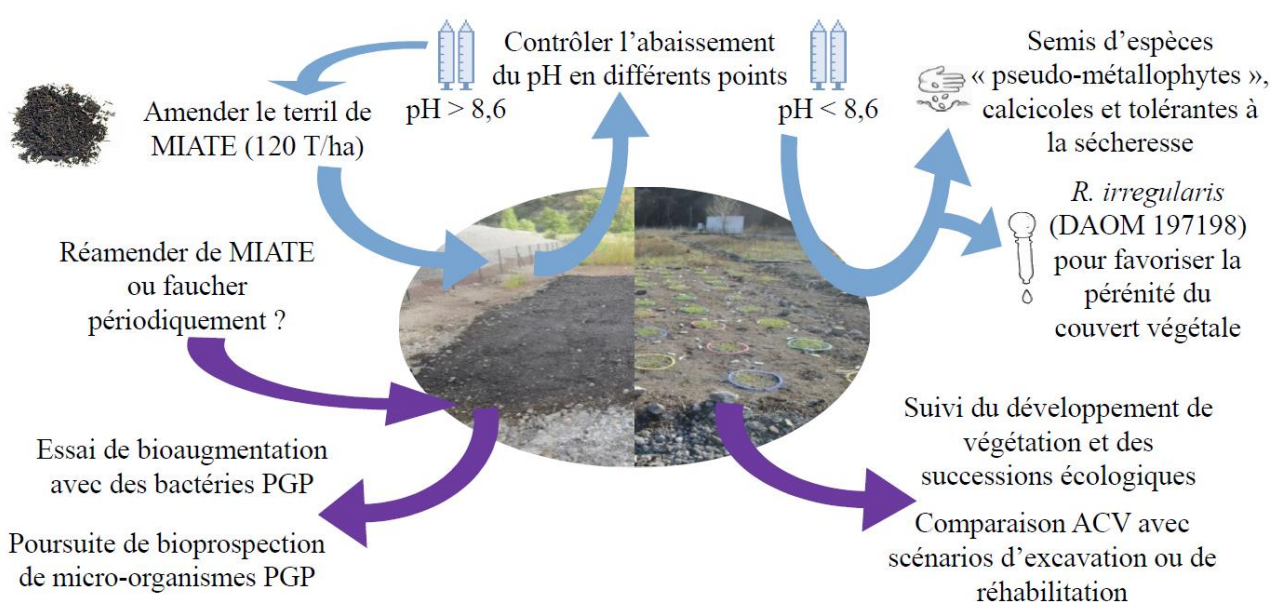
Les effets d'une inoculation de bactéries susceptibles de promouvoir la croissance végétale, car productrices d'IAA, et de spores de champignon mycorhizien à arbuscules (*Ri DAOM197198*) ont ensuite été comparés. L'inoculation de 6 souches productrices d'IAA a affecté négativement le développement à court terme du couvert végétal. A l'inverse, l'inoculation de *Ri* s'est révélée efficace pour stimuler la colonisation végétale sur l'essai de phytostabilisation *in situ*. L'évolution de la couverture végétale suivie par traitement d'images (Figure 14) a permis de mettre en évidence une colonisation végétale plus intense chez les spots inoculés avec *Ri*, 2 mois après l'ensemencement de la parcelle.

Il conviendrait de vérifier que les souches bactériennes employées lors de cette culture préliminaire, qu'elles soient inoculées seules ou en consortium, permettent effectivement d'améliorer la croissance des plantes à plus long terme, leurs tolérance aux contraintes rencontrées sur ce milieu et donc le procédé de phytostabilisation. Des études supplémentaires

de bioprospection peuvent également être envisagées afin de sélectionner d'autres potentielles PGPB. L'extrapolation des préconisations mises en évidence dans ces travaux de thèse à l'ensemble du terril d'étude permettra, par le suivi du développement de la végétation et des interactions vivantes s'y déroulant, d'étudier les successions écologiques ayant cours sur ce terrain ainsi que d'améliorer la résilience et le développement de l'écosystème installé par exemple en évaluant l'effet de fauchages ou de réapproports périodiques en MIATE.



**Figure 14** : Illustration de la segmentation du vert pour la détection de la végétation



**Figure 15** : Préconisations mises en évidence pour initier une phytostabilisation sur terril de laitier d'aciérie (flèches bleues) et perspectives à ces travaux de thèse (flèches violettes)





## References

- ADEME (2019).** Rapport d'activité 2018, juillet 2019 – 32 p. - Réf. 010832.
- Adeniyi, O.N., Ojo, A.O., Akinbode, O.A. and Adediran, J.A. (2011).** Comparative study of different organic manures and NPK fertilizer for improvement of soil chemical properties and dry matter yield of maize in two different soils. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 2(1):9-13.
- AFNOR (2008).** Soil quality – Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. *International Standard ISO 17402:2008*.
- Agnello, A.C., Potysz, A., Fourdrin, C., Huguenot, D. and Chauhan, P.S. (2018).** Impact of pyrometallurgical slags on sunflower growth, metal accumulation and rhizosphere microbial communities. *Chemosphere*, 208:626-639.
- Agnello, A.C., Potysz, A., Fourdrin, C., Huguenot, D. and Chauhan, P.S. (2018).** Impact of pyrometallurgical slags on sunflower growth, metal accumulation and rhizosphere microbial communities. *Chemosphere*, 208:626-639.
- Ahemad, M. (2015).** Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. *Biotechnology*, 5:11-121.
- Ahemad, M. and Kibret, M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Jouranl of King Saud University – Science*, 26:1-20.
- Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. (1991).** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12:39-45.
- Alexander, M. (2000).** Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*, 34:4259-4265.
- Allison, J.D. (1991).** Geochemical assessment model for environmental systems: version 3.0, user's manuel. *British Library, Document Supply Center*.
- Almeida, C.M.R., Dias, A.C., Mucha, A.P., Bordalo, A.A. and Vasconcelos, M.T.S.D. (2009).** Influence of surfactants on the Cu phytoremediation potential of a salt marsh plant. *Chemosphere*, 75:135-140.
- Alvarez-Lopez, V., Prieto-Fernandez, A., Janssen, J., Herzig, R., Vangronsveld, J., Kidd, P.S. (2016b).** Inoculation methods using *Rhodococcus erythropolis* strain P30 affects bacterial assisted phytoextraction capacity of *Nicotiana tabacum*. *International Journal of*

*Phytoremediation*, 18:406-415.

**Anatole-Monnier, L. (2014).** Effets de la contamination cuprique des sols viticoles sur la sensibilité de la vigne à un cortège de bio-agresseurs. *Thèse de doctorat, Université de Bordeaux*.

**Anderson, T.H. (2003).** Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 98:285-293.

**Azcón, R., del Carmen Perálvarez, M., Roldán, A. and Barea, J.M. (2010).** Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a Multicontaminated Soil Alleviate Metal Toxicity in Plants. *Microbial ecology*, 59:668-677.

**Babu, A.G. and Reddy, M.S. (2011).** Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and nutrient status of bermudgrass grown in alkaline bauxite processing residue. *Environmental pollution*, 159(1):25-29.

**Bambara, S. and Ndakidemi, P.A. (2010).** The potential roles of lime and molybdenum on the growth, nitrogen fixation and assimilation of metabolites in nodulated legume: A special reference to *Phaseolus vulgaris* L. *African Journal of Biotechnology*, 8(17):2482-2489.

**Bardgett, R. D., Mommer, L., & De Vries, F. T. (2014).** Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. *Trends in Ecology & Evolution*, 29:692-699.

**Barker, A.V. and Pilbeam, D.J. (2015).** Handbook of Plant Nutrition – Second Edition. *CRC Press, Taylor and Francis Group*, 743 pp.

**Barea, J.M., Azcon, R. and Azcon-Aguilar, C. (2005).** Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: *Varma A., Buscot F. (eds) Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Soil biology, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg*, pp. 195-212.

**Bartet, B. (2001).** Caractérisation des Mâchefers d'incinération d'ordures ménagères : Étude sur les possibilités de transfert de dioxines vers l'environnement. Institut national de l'environnement industriel et des risques.

**Bartram, A.K., Jiang, X., Lynch, M.D., Masella, A.P., Nicol, G.W., Dushoff, J. and Neufeld, J. (2014).** Exploring links between pH and bacterial community composition in soils from the Craibstone Experimental Farm. *FEMS Microbiology Ecology*, 87:403-415.

**Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service (2019).** Inventaire historique des sites activités de service. Disponible sur : [infoterre.brgm.fr/page/anciens-sites-industriels-basias](http://infoterre.brgm.fr/page/anciens-sites-industriels-basias)

**Bayless, E.R. and Schulz, M.S. (2003).** Mineral precipitation and dissolution at two slag-disposal sites in northwestern Indiana, USA. *Environmental Geology*, 45:252-261.

- Bélanger, P.A., Beaudin, J. and Roy, S. (2011).** High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. *Journal of Microbiological Methods*, 85:92-97.
- Benett, A.E. and Classen, A.T. (2020).** Climate change influences mycorrhizal fungal–plant interactions, but conclusions are limited by geographical study bias. *Ecology*, 101(4).
- Benizri, E. and Kidd, P. (2018).** The Role of the Rhizosphere and Microbes Associated with Hyperaccumulator Plants in Metal Accumulation. In *Agromining: Farming for metals* (pp. 157-188). Springer, Cham.
- Berthelot, C. Leyval, C., Foulon, J., Chalot, M. and Blaudez, D. (2016).** Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 10.
- Bevers, L.E., Hagedoorn, P. and Hagen, W.R. (2009).** The bioinorganic chemistry of tungsten. *Coordination Chemistry reviews*, 253(3-4):269-290.
- Bolan, N.S. and Duraisamy, V.P. (2003).** Role of inorganic and organic soil amendments on immobilization and phytoavailability of heavy metals: a review involving specific case studies. *Australian Journal of Soil Research*, 41:533-555.
- Bolan, N.S., Park, J. H., Robinson, B., Naidu, R. and Huh, K. Y. (2011).** Phytostabilization: a green approach to contaminant containment. *Advances in Agronomy*, 112:145-204.
- Boruvka, L., Vacek, O., Jehlicka, J. (2005).** Principal component analysis as a tool to indicate the origin of potentially toxic elements in soils. *Geoderma*, 128:289–300.
- Bouchardon, J.L., Faure, O., Lespagnol, G., Moutte, J., Guy, B., Mimoun, D., Graillet, D., Paran, F., Croze, F., Athénol, J.D., Fernando, B., Boisson, J., Perret, S., Hitmi, A., Verney, P., Moussard Gauthier, C., Ledoigt, G., Goupil, P., Sac, C. and M. Mench (2014).** “PHYSAFIMM: la PhytoStabilisation, méthodologie Applicable aux Friches Industrielles, Métallurgiques et Minières”, Rapport final. ADEME, 158pp.
- Blum, W. E. H. (2005).** Soils and Climate Change. *Journal of Soils and Sediments*, 5:67-68.
- Bradl, H.B. (2005).** Sources and origins of heavy metals. *Interface Science and Technology*, 6:1-27.
- Braud, A., Jezequel, K., Bazot, S. and Lebeau, T. (2009).** Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere*, 74:280-286.
- Braun-Blanquet, J. (1964).** Résultats de trois excursions géobotaniques à travers le Portugal septentrional et moyen. *Agronomia Lusitana*.



- Brautignan, D.J., Rengasamy, P. and Chittleborough, D.J. (2012).** Aluminium speciation and phytotoxicity in alkaline soils. *Plant Soil*, 360:187-196.
- Breulmann, G., Markert, B., Weckert, V., Herpin, U., Yoneda, R. and Ogino, K. (2002).** Heavy metals in emergent trees and pioneers from tropical forest with special reference to forest fires and local pollution sources in Sarawak, Malaysia. *Science of the total environment*, 285:107-115.
- Brooker, R.W., Kikvidze, Z. (2008).** Importance: an overlooked concept in plant interaction research. *Journal of Ecology*, 96(4):703-708.
- Brooks, R.R. and Robinson, B.H. (1998).** The potential use of hyperaccumulators and other plants for phytomining. In *Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining*, CAB international.
- Brown, P.H., Welch, R.M. and Cary, E.E. (1987).** Nickel: A Micronutrient Essential for Higher Plants. *Plant Physiology*, 85:801-803.
- Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R. (2000).** Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 46:237-245.
- Burges, A., Alkorta, I., Epelde, L. and Garbisu, C. (2018).** From phytoremediation of soil contaminants to phytomanagement of ecosystem services in metal contaminated sites. *International Journal of Phytoremediation*, 20:384-397.
- Buscot, F. (2005).** What are soils? In: Varma A., Buscot F. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Soil biology, vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg*, pp. 3–18.
- Calabrese, S., Aiuppa, A., Allard, P., Bagnato, E., Bellomo, S., Brusca, L., D'Alessandro, W., Parelo, F. (2011).** Atmospheric sources and sinks of volcanogenic elements in a basaltic volcano (Etna, Italy). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75:7401-7425.
- Calvet R. (2003).** Le sol : propriétés et fonctions. Phénomènes physiques et chimiques, applications agronomiques et environnementales. *France Agricole Editions*.
- Cappunys, V., Swennen, R. and Devivier, A. (2006).** Dredged river sediments: Potential chemical time bombs? A case study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 171:49-66.
- Carney, K.M. and Matson, P.A. (2005).** Plant communities, soil microorganisms, and soil carbon cycling: Does altering the world belowground matter to ecosystem functioning? *Ecosystems*, 8:928-940.
- Carvalho, L.C., Dennis, P.G., Fan, B., Fedoseyenko, D., Kierul, K., Becker, A., Von Wiren, N. and Borriss, R. (2013).** Linking Plant Nutritional Status to Plant-Microbe Interactions. *PLOS ONE*, 8(7).

**Castrillo, G., Teixeira, P.J.P.L. Paredes, S.H., Law, T.F., De Lorenzo, L., Feltcher, M.E., Finkel, O.M., Breakfield, N.W., Mieczkowski, P., Jones, C.D., Paz-Ares, J. and Dangl, J.L. (2017).** Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature*, 543, 513-518.

**Centre Technique et de Promotion des Laitiers sidérurgiques (2018).** Statistiques 2018.  
**Cerdeira-Perez, A., Monterroso, C., Rodriguez-Garrido, B., Machinet, G., Echevarria, G., Prieto-fernandez, A. and Kidd, P.S. (2019).** Implementing nickel phytomining in a serpentine quarry in NW Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 197:1-13.

**Chai, L., Huang, S., Yang, Z., Peng, B. Huang, Y. and Chen, Y. (2009).** Cr (VI) remediation by indigenous bacteria in soils contaminated by chromium-containing slag. *Journal of Hazardous Materials*, 167:516-522.

**Chaney, R.L., Reeves, P.G., Ryan, J.A., Simmons, R.W., Welch, R.M. and Angle, J.S. (2004).** An improved understanding of soil Cd risk to humans and low cost methods to phytoextract Cd from contaminated soils to prevent soil Cd risks. *Biometals*, 17:549-553.

**Chaney, R.L. and Baklanov, I.A. (2017).** Phytoremediation and Phytomining: Status and Promise. *Advances in Botanical Research*, 83:189-221.

**Chen, W., Krage, N., Wu, L., Pan, G., Khosrivafard, M. and Chang, A.C. (2008).** Arsenic, Cadmium, and Lead in California Croplands Soils : Role of Phosphate and Micronutrient Fertilizers. *Journal of Environmental Quality*, 37.

**Cheng, H., Xu, W., Liu, J., Zhao, Q., He, Y. and Chen, G. (2007).** Application of composted sewage sludge (CSS) as a soil amendment for turfgrass growth. *Ecological engineering*, 29:96-104.

**Chintala, R., Mollinedo, J., Schumacher, T.E., Malo, D.D. and Julson, J.L. (2014).** Effect of biochar on chemical properties of acidic soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(3):393-404.

**Clark, R. Á., & Zeto, S. K. (2000).** Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of plant Nutrition*, 23:867-902.

**Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. (2009).** The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37:141-145.

**Cottingham, M.G., Bain, C.D. and Vaux, J.T. (2004).** Rapid method for measurement of surface tension in multiwell plates, *Laboratory Investigation*, 84:523-529.

- Csavina, J., Field, J., Taylor, M.P., Gao, S., Landazuri, A., Betterton, E.A. and Saez, A.E. (2012).** A review on the importance of metals and metalloids in atmospheric dust and aerosol from mining operations. *Science of the total environment*, 433:68-73.
- Cuff, D.J. and Goudie, A. (2009).** The oxford companion to global change. *Oxford University Press, Oxford*.
- Cunningham, S.D. and Berti, R. (2000).** Phytoextraction and Phytostabilization: Technical, Economic, and Regulatory Considerations of the Soil-Lead Issue. *N. Terry, G. Banuelos (Eds.), Phytoremediation of contaminated soil and water, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA*.
- Cundy, A.B., Bardos, R.P., Puschenreiter, M., Mench, M., Bert, V., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Li, X.N., Weyens, N., Witters, N. and Vangronsveld, J. (2016).** Brownfields to green fields: Realising wider benefits from practical contaminant phytomanagement strategies. *Journal of Environmental Management*, 184:67-77.
- Cycoń, M., Mroziak, A. and Piotrowska-Seget, Z. (2017).** Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*, 172:52-71.
- D'Antonio, C. and Chambers, J. C. (2006).** Using ecological theory to manage or restore ecosystems affected by invasive plant species. *In D. Falk, M. Palmer, and J. Zedler (eds). Foundations of Restoration Ecology. Island Press, Covelo, CA*.
- Da Silva, W.R., Vieira da Silva, F.B., Araujo, P.R.M. and Do Nascimento, C.W.A. (2017).** Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144:522-530.
- Das, B., Prakash, S., Reddy, P.S.R. and Misra, V.N. (2007).** An overview of utilization of slag and sludge from steel industries. *Resources, Conservation and Recycling*, 50:40-57.
- Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Shirali, P., Grandmougin-Ferjani, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2009).** Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry*, 70:1421-1427.
- De Boom, A., Degrez, M., Carvalho, J. and Correia, M.J.N. (2007).** Lixiviação ácida de resíduos de depuração das fuméas de incineração de resíduos domésticos (REFIOM). *Déchets – Revue Francophone d'écologie industrielle*, 48.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. and Chauhan, S.M. (2004).** Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 159(4):371-394.
- Dimpka, C., Svatos, A., Merten, D., Buchel, G. and Kothe, E. (2008).** Hydroxamate

siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 54:163-172.

**Echevarria, G., Van Der Ent, A., Baker, A., Bani, A., Benizri, E., Laubie, B., Morel, J.L. and Simonnot, M.O. (2015).** Phytoextraction and phytomining of trace elements from soils. *XXXV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo*, Natal, Brazil.

**Eisenhauer, N., Hebler, H., Engels, C., Gleixner, G., Habekost, M., Milcu, A., Partsch, S., Sabais, A.C.W., Scherber, C., Weiglet, A., Weisser, W.W. and Scheu, S. (2010).** Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology*, 91(2):485-496.

**Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabae, A. A., Etesami, H., Motasharezadeh, B., & Sarmadian, F. (2020).** Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere*, 14:100196.

**Epstein, E. (1966).** Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature*, 212, 1324-1327.

**Epstein, E. and Bloom, A.J. (2005).** Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. *2<sup>nd</sup> Edition*, Sinauer Associated, Sunderland.

**Ernst, W.H.O. (1998).** Invasion, dispersal and ecology of the South African neophyte *Senecio inaequidens* in The Netherlands: from wool alien to railway and road alien. *Acta botanica neerlandica. Acta botanica neerlandica*, 47:131-151.

**Escudero-Almanza<sup>1</sup>, D.J., Ojeda-Barrios, D.L., Hernandez-Rodriguez, O.A., Sanchez Chavez, E., Ruiz-Anchondo<sup>1</sup>, T. and Sida-Arreola<sup>1</sup>, J.P. (2012).** Carbonic anhydrase and zinc in plant physiology. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72 (1):141-146.

**Etesami, H. and Maheshwari, D.K. (2018).** Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156:225-246.

**Exley, C. (2003).** A biogeochemical cycle for aluminium ? *Journal of inorganic biochemistry*. 97:1:7.

**Exley, C. (2016).** The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie*, 100:51-55.

**Firmin, S., Labidi, L., Fontaine, J., Laruelle, F., Tisserant, B., Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Dalpe, Y., Grandmoulin, A., Douay, F., Shirali, P., Verdin, A. and Lounes-Hadj Sahraoui, A. (2015).** Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation protects *Miscanthus* ×

giganteus against trace element toxicity in a highly metal-contaminated site. *Science of the Total Environment*, 527: 91-99.

**Foy, C.D, Chaney, R.L. and Parberry, D.G. (1978).** Aluminium Toxicity for Plants. *Plant Physiologist*, 29:511-566.

**Forján, R., Asension, V., Rodriguez-Vila, A. and Covelo, E.F. (2016).** Contribution of waste and biochar amendment to the sorption of metals in a copper mine tailing. *CATENA*, 137:120-125.

**François, V. (2004).** Détermination d'indicateurs d'accélération et de stabilisation de déchets ménagers enfouis: Étude de l'impact de la recirculation de lixiviats sur colonnes de déchets. *Laboratoire des Sciences et Techniques*.

**Frausto da Silva, J. J. R. and Williams, R. J. P. (2001).** The Biological Chemistry of Elements, *The Inorganic Chemistry of Life. Second Edition. Oxford university Press, Oxford*, 561 pp.

**Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A. and Escarré, J. (2006).** Specific Interactions between Local Metallicolous Plants Improve the Phytostabilization of Mine Soils. *Plant and Soil*, 282:53-65.

**Frausto da Silva, J. J. R. and Williams, R. J. P. (2001).** The Biological Chemistry of Elements, *The Inorganic Chemistry of Life. Second Edition*.

**Gadd, G.M. (2004).** Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122:109-119.

**Gadd, G.M. (2010).** Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156:609-643.

**Gaertner, M., Breeyen, A.D., Hui, C. and Richardson, D.M. (2009).** Impacts of alien plant invasions on species richness in Mediterranean-type ecosystems: a meta-analysis. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 33, 3.

**Galkin, M.P., Larionov, V.S., Stepanov, A.V., Nebol'sin, V.A., Milovanov, I.F. and Nikitin, G.S. (1998).** Use of steelmaking slags. *Metallurgist*, 42, 9.

**Gambetta G.A., Knipfer T., Fricke W., McElrone A.J. (2017).** Aquaporins and root water uptake. In: Chaumont F., Tyerman S. (eds), *Plant Aquaporins. Signaling and Communication in Plants*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49395-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49395-4_6)

**Garavaglia, L., Cerdeira, S.B. and Vullo, D.L. (2010).** Chromium (VI) biotransformation by  $\beta$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria from natural polluted environments: A combined biological and chemical treatment for industrial wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 175:104-110.

- Garcia, K. and Zimmermann, S.D. (2014).** The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Frontiers in Plant Science*, 5, 337 pp.
- Ge, Y, Murray, P. and Hendershot, W.H. (2000).** Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution*, 107(1):137-144.
- Geisseler, D. and Scow, K.M. (2014).** Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 75:54-63.
- Ghasemi, Z., Ghaderian, S.M., Monterroso, C. and Kidd, P.S. (2018).** Improving the growth of Ni-hyperaccumulating plants in serpentine quarry tailings. *International Journal of Phytoremediation*, 20, 7.
- Giller, K.E., Witter, E. and McGrath, S.P. (2009).** Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:2031-2037.
- Giovannetti, M., Tolosano, M., Volpe, V., Kopriva, S. and Bonfante, P. (2014).** Identification and functional characterization of a sulfate transporter induced by both sulfur starvation and mycorrhiza formation in *Lotus japonicas*. *New Phytologist*, 204:609-619.
- Giri, B., Giang, P.H., Kumari, R., Prasad, R. and Varma, A. (2005).** Microbial diversity in soils. In: Varma A., Buscot F. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Soil biology, vol 3*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 19-55.
- Glick, B.R. (2003).** Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21:383-393.
- Gnanamani, A., Kavitha, V., Radhakrishnan, N., Rajakumar, G.S., Sekaran, G. and Mandal, A.B. (2010).** Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2):334-339.
- Gomes, H. I., Mayes, W. M., Rogerson, M., Stewart, D. I. and Burke I. T. (2016).** Alkaline residues and the environment: a review of impacts, management practices and opportunities. *Journal of Cleaner Production*, 122:3571-3582.
- Gomes, H. I., Mayes, W. M., Whitby, P. and Rogerson, M. (2019).** Constructed wetlands for steel slag leachate management: partitioning of arsenic, chromium, and vanadium in waters, sediments, and plants. *Journal of Environmental Management*, 243:30-38.
- Goransson, P., Olsson, P.A., Postma, J. and Falkengren-Grerup, U. (2008).** Colonisation by arbuscular mycorrhizal and fine endophytic fungi in four woodland grasses – variation in relation to pH and aluminium. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:2260-2265.



- Grandlic, C.J., Palmer, M.W. and Maier, R.M. (2009).** Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization. of mine tailings. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1734-1740.
- Griffiths, B.S., Monkowski, M., Roy, S. and Ritz, K. (2001).** Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology*, 16(1):49-61.
- Guerrero-Zúñiga, A.L., López-López, E., Rodríguez-Tovar, A.V. and Rodríguez-Dorantes, A. (2019).** Functional Diversity of Plant Endophytes and Their Role in Assisted Phytoremediation. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*, 237:255.
- Guo, D., Xia, M., Wei, X., Chang, W., Liu, Y. and Wang, Z. (2008).** Anatomical traits associated with absorption and mycorrhizal colonization are linked to root branch order in twenty-three Chinese temperate tree species. *New Phytologist*, 180(3).
- Gupta, P. and Kumar, V. (2017).** Value added phytoremediation of metal stressed soils using phosphate solubilizing microbial consortium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33:9.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. and Manresa, A. (2000).** Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3):379-387.
- Han, F.X., Banin, A., Su, Y., Mnts, D.L., Plodinec, M.J., Kingery, W.L. and Triplett, G.E. (2002).** Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. *Naturwissenschaften*, 89:497-504.
- Harrison, E. and Brockhurst, M.A. (2012).** Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends in microbiology*, 20:262-267.
- Hattab, N., Soubrand, M., Guégan, R., Motelica-Heino, M., Bourrat, X., Faure, O. and Bouchardon, J. L. (2014).** Effect of organic amendments on the mobility of trace elements in phytoremediated techno-soils: role of the humic substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:10470-10480.
- He, X.Y., Wang, K.L., Wei, Z., Chen, Z.H., Zhu, Y.G. and Chen, H.S. (2008).** Positive correlation between soil bacteria metabolic and plant species diversity and bacterial and fungal diversity in a vegetation succession on Karst. *Plant Soil*, 307:123-134.
- Hider, R.C. and Kong, X. (2010).** Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27:637-657.
- Hildebrandt, U., Regvar, M. and Bothe, H. (2007).** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68:139-146.

- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. and Jaillard, B. (2003).** Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248:43-59.
- Hitsuda, K., Yamada, M. and Klepker, D. (2005).** Sulfur requirement of eight crops at early stages of growth. *Agronomy Journal*, 97:155-159.
- Hopkins, B. and Ellsworth, J. (2005).** Phosphorus availability with alkaline/calcareous soil. *Western Nutrient Management Conference, Salt Lake City, UT*, 6.
- Houben, D., Evrard, L., Sonnet, P. (2013).** Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar. *Chemosphere*, 92:1450-1457.
- Houecande, O. (2016).** Chimie de l'eau et transport particulaire dans un crassier sidérurgique: de la zone non saturée à la zone saturée. *Thèse de doctorat, Mines Saint-Etienne, Saint-Etienne*.
- Hryniewicz, K. and Baum, C. (2011).** The Potential of Rhizosphere Microorganisms to Promote the Plant Growth in Disturbed Soils. *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development*, 35-64.
- Husson, F., Lê, S. et Pagès, J. (2009).** Analyse des données avec R, *Presses Universitaires de Rennes*, 224 pp.
- Ibañez, S. G., Oller, A. L. W., Paisio, C. E., Alderete, L. G. S., González, P. S., Medina, M. I., & Agostini, E. (2018).** The challenges of remediating metals using phytotechnologies. Heavy metals in the environment: microorganisms and bioremediation. *CRC Press, Taylor & Francis*, 173-191.
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A. and Kopriva, S. (2017).** The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition – Current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 8:1617.
- Jameson, P.E. (2000).** Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. *Plant Growth Regulation*, 32:369-380.
- Janouskova, M., Krak, K., Vosatka, M., Puschel, D. and Storchova, H. (2017).** Inoculation effects on root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities spread beyond directly inoculated plants. *PLOS ONE*, 12(7).
- Janssen, P.H. (2006).** Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3):1719-1728.
- Javot, H. and Maurel, C. (2002).** The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90:301-313.



- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. and Barea, J-M. (2003).** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 37:1-16.
- Johnson, D.R. Inouye, L.S., Bednar, A.J., Clarke, J.U., Winfield, L.E., Boyd, R.E., Ang, C.Y. and Goss, J. (2009).** Tungsten bioavailability and toxicity in sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Land Contamination and Reclamation*, 17(1).
- Johnson, J.W., Oelkers, E.H. and Helgeson, H.C. (1992).** SUPCRT92: A software package for calculating the standard molal thermodynamic properties of minerals, gases, aqueous species, and reactions from 1 to 5000 bars and 0 to 1000°C. *Computers and Geosciences*, 18(7):899-947.
- Johri, J.K., Surange, S. and Nautiyal, C.S. (1999).** Occurrence of Salt, pH, and Temperature-tolerant, Phosphate-solubilizing Bacteria in Alkaline Soils. *Current Microbiology*, 39:89-93.
- Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G. and Van Hees, P.A.W. (2003).** Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*, 248:31-41.
- Juniper, S. and Abbott, L.K. (2006).** Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16:371-379.
- Kabata-Pendias, A. (2011).** Trace elements in soils and Plants – Fourth Edition. *CRC Press, Taylor and Francis Group Boca Raton, FL*, 505 pp.
- Kaplan, R. Vaziri, M. and Zwiazek, J.J. (2018).** Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research*, 51:4.
- Kaya, C., Ashraf, M., Sonmez, O., Aydemir, S., Tuna, A.L., Cullu, M.A. (2009).** The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity, *Scientia Horticulturae*, 121:1-6.
- Kembell, S.W., O'Connor, T.K., Arnold, H.K., Hubell, S.P., Wright, S.J. and Green, J.L. (2014).** Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *PNAS*, 111(38): 13715-13720.
- Khalil, M.I., Hossain M.B. and Schmidhalter, U. (2005).** Carbon and nitrogen mineralization in different upland soils of the subtropics treated with organic materials. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:1507-1518.
- Khan, A., Singh, J., Upadhyay, V.K., Singh, A.V. and Shah, S. (2019).** Microbial Biofortification: A green technology through plant growth promoting microorganisms. In: *Shah S., Venkatramanan V., Prasad R. (eds) Sustainable Green Technologies for Environmental Management. Springer, Singapore*, pp. 255-269.

- Khan, M.S., Ahmad, E., Zaidi, A. and Oves, M. (2013).** Functional Aspect of Phosphate-Solubilizing Bacteria: Importance in Crop Production. *Bacteria in Agrobiological Crop productivity*, 237:263.
- Kidd, P.S. and Proctor, J. (2000).** Effects of aluminium on the growth and mineral composition of *Betula pendula* Roth. *Journal of experimental Botany*, 51:1057-1066.
- Kidd, P., Mench, M., Alvarez-Lopez, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangrosveld, J. and Puschenreiter, M. (2015).** Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation*, 17:1005-1037.
- Kidd, P.S., Alvarez-Lopez, V., Becerra-Castro, C., Cabello-Conejo, M. and Prieto-Fernandez, A. (2017).** Potential Role of Plant-Associated Bacteria in Plant Metal Uptake and Implications in Phytotechnologies. *Advances in Botanical Research*, 83:87-126.
- Kim, K.R., Owens, G., Naldu, R. and Kim, K.H. (2007).** Assessment techniques of heavy metal bioavailability in soil – A critical review. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 40(4):311-325.
- Kirchgeorg, T., Weinberg, I., Hornig, M., Baier, R., Schmid, M.J. and Brockmeyer, B. (2018).** Emissions from corrosion protection systems of offshore wind farms: Evaluation of the potential impact on the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 136:257-268.
- Klee, R.J. and Graedel, T.E. (2004).** Elemental cycles: A Status Report on Human or Natural Dominance. *Annual Review of Environmental Resources*, 29:69-107.
- Koedrith, P., Kim, H., Weon, J. I. and Seo, Y. R. (2013).** Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216:587-598.
- Kopittke, P.M., Menzies, N.W. and Fulton, I.M. (2004).** Gypsum solubility in seawater, and its application to bauxite residue amelioration. *Australian Journal of Soil Research*, 42:953-960.
- Kopittke, P.M., Menzies, N.W., Wang, P., Pax, F. and Blaney, C. (2016).** Kinetics and nature of aluminium rhizotoxic effects: a review. *Journal of Experimental Botany*, 67:4451-4467.
- Kranner, I. and Colville, L. (2011).** Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 72:93-105.

- Kudoyarova, G.R., Arkhipova, T.N. and Melent'ev, A.I. (2015).** Role of Bacterial Phytohormones in Plant Growth Regulation and Their Development. *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*, 69-86.
- Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M. and Sessitsch, A. (2008).** Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil*, 304:35-44.
- Kumar, A., Mangla, C., Aggarwal, A. and Parkash, V. (2010).** Arbuscular mycorrhizal fungal dynamics in the rhizospheric soil of five medicinal plant species. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 6:281-288.
- Kumpiene, J., Bert, V., Dimitriou, I., Eriksson, J., Friesl-Hanl, W., Galazka, R., Herzig, R., Janssen, J., Kidd, P., Mench, M., Müller, I., Neu, S., Oustriere, N., Puschenreiter, M., Renella, G., Roumier, P.H., Siebielec, G., Vangronsveld, J. and Manier, N. (2014).** Selecting chemical and ecotoxicological test batteries for risk assessment of trace element-contaminated soils (phyto)managed by gentle remediation options (GRO). *Science of the total environment*, 496:510-522.
- Kuramae, E., Gamper, H., Van Veen, J. and Kowalchuk, G. (2011).** Soil and plant factors driving the community of soil-borne microorganisms across chronosequences of secondary succession of chalk grasslands with a neutral pH. *FEMS Microbial Ecology*, 77:285-294.
- Kuske, C.R., Ticknor, L.O., Miller, M.E, Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, S.M. and Belnap, J. (2002).** Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in an Arid Grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1854.
- Labidi, S., Jeddi, F.B., Tisserant, B., Debiame, D., Rezgui, S., Grandmougin-Ferjani, A., Sahraoui, A.L. (2012).** Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO<sub>3</sub> stress. *Mycorrhiza*, 22:337-345.
- Lacercat-Didier, L., Berthelot, C., Foulon, J., Errard, A., Martino, E. and Chalot, M. (2016).** New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance. *Mycorrhiza*, 26:657-671.
- Lal, R. (2015).** Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. *Sustainability*, 7:5875-5895.
- Lane, D. (1991).** 16s/23s rRNA sequencing. In: Stackerbrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England, 115:175.

- Lauber, C.L., hammady, M., Knight, R. and Fierer, N. (2009).** Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15):5111-5120.
- Le Coze, J. (2012).** L'acier fondu au creuset en France au 19e siècle : héritage de l'Orient et naissance des aciers spéciaux – I : Description des outils et des procédés de fusion en creuset depuis le 9e jusqu'au 20e siècle. *Matériaux et Techniques*, 100:343-366.
- Le Coze, J. (2017).** Récits sidérurgiques d'hier et d'aujourd'hui, Fers, fontes, aciers : 4000 ans d'affinage et de purification. *EDP Sciences*.
- Leung, H-M., Wang, Z-W., Ye, Z-H., Yung, K-L., Peng, X-L. and Cheung, K-C. (2013).** Interactions between arbuscular mycorrhizae and plants in phytoremediation of metal-contaminated soils: a review. *Pedosphere*, 23:549-563.
- Lê, S., Josse, J. and Husson, F. (2008).** FactoMineR: A package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1):1–18.
- Lesley, J.P. (1859).** The iron manufacturer's guide to the furnaces, forges and rolling mills of the United States. *Edition J. Wiley, New York*.
- Leung, H.M., Wang, Z.W., Ye, Z.H., Yung, K.L., Peng, X.L. and Cheung, K.C. (2013).** Interactions Between Arbuscular Mycorrhizae and Plants in Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils: A Review. *Pedosphere*, 23:549-563.
- Li, H., Smith, S.E., Holloway, R.E., Zhu, Y. and Smith, F.A. (2006).** Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist*, 172:536-543.
- Li, W., Khan, M.A., Yamaguchi, S. and Kamiya, Y. (2005).** Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 46:45-50.
- Li, Y., Wen, H., Chen, L. and Yin, T. (2014).** Succession of bacterial community structure and diversity in soil along a chronosequence of reclamation on coal mine spoils in China. *PLoS ONE*, 9:12.
- Liu, J., Guo, W.Q. and Shi, D.C. (2010).** Seed germination, seedling survival, and physiological response of sunflowers under saline and alkaline conditions. *Photosynthetica*, 48(2):278-286.
- Liu, W., Hou, J., Wang, Q., Yang, H., Luo, Y. and Christie, P. (2014).** Collection and analysis of root exudates of *Festuca arundinacea* L. and their role in facilitating the phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Plant Soil*, 389:109-119.

- Llanes, A., Andrade, A., Masciarelli, O., Alemano, S. and Luna, V. (2016).** Drought and salinity alter endogenous hormonal profiles at the seed germination phase. *Seed Science Research*, 26:1-13.
- Lock, K. and Janssen, C.R. (2003).** Influence of aging on copper bioavailability in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:1162-1166.
- Lottermoser, B.G. (2010).** Introduction to Mine Wastes. *Mine Wastes, Springer Berlin Heidelberg*, 1-41.
- Lozupone, C.A. and Knight, R. (2007).** Global patterns in bacterial diversity. *PNAS USA*, 104:11436-11440.
- Luo, Y., Wu, X., Sun, H. and Wu, Y. (2020).** Root-induced changes in aggregation characteristics and potentially toxic elements (PTEs) speciation in a revegetated artificial zinc smelting waste slag site. *Chemosphere*, 243: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125414>
- Luo, Y., Wu, Y., Shu, J. and Wu, Z. (2019).** Effect of particulate organic matter fractions on the distribution of heavy metals with aided phytostabilization at a zinc smelting waste slag site. *Environmental Pollution*, 253:330-341.
- Luo, Y., Wu, Y., Wang, H., Xing, R., Zheng, Z., Qiu, J., Yang, L. (2018).** Bacterial community structure and diversity responses to the direct revegetation of an artisanal zinc smelting slag after 5 years. *Environmental Science and Pollution Research*, 25:14773-14788.
- Luo, Y., Wu, Y., Xing, R., Yao, C, Shu, J. and Wu, Z. (2018).** Effects of plant litter decomposition on chemical and microbiological characteristics of artisanal zinc smelting slag using indigenous methods. *Journal of Geochemical Exploration*, 190:292-301.
- Ma, H., Yang, H., Lü, X., Pan, Y., Wu, H., Liang, Z. and Ooi, M.K.J. (2015).** Does high pH give a reliable assessment of the effect of alkaline soil on seed germination? A case study with *Leymus chinensis* (Poaceae). *Plant and Soil*, 394:35-43.
- Ma, X., Luo, W., Li, J. and Wu, F. (2019).** Arbuscular mycorrhizal fungi increase both concentrations and bioavailability of Zn in wheat (*Triticum aestivum* L) grain on Zn-spiked soils. *Applied Soil Ecology*, 135:91-97.
- Macy, J.M., Santini, J.M., Pauling, B.V., O'Neil, A.H. and Sly, L.I. (2000).** Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria : mechanisms of arsenate reduction. *Archives Microbiology*, 173:49-57.
- Marra, L.M., Oliveira-Longatti, S.M., Soares, C.R.F.S., Lima, J.M., Olivares, F.L., Moreira, F.M.S. (2015).** Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2):367-375.

- Marschner, H., & Dell, B. (1994).** Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and soil*, 159: 89-102.
- Marschner, P. (2012).** Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants – Third Edition. *Academic Press, Elsevier*, 651 pp.
- Marschner, P., Crowley, D. and Rengel, Z. (2011).** Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 43:883-894.
- Marschner, P., Crowley, D. and Yang, C.H. (2004).** Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261:199-208.
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R., and Crowley, D.E. (2001).** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1437-1445.
- Markert, B. (1992).** Establishing of "reference plant" for inorganic characterization of different plant species by chemical fingerprint. *Water, Air, and Soil Pollution*, 64:533-538.
- Markowicz, A., Wozniak, G., Borymski, S., Piotrowska-Seget, Z. and Chmura, D. (2015).** Links in the functional diversity between soil microorganisms and plant communities during natural succession in coal mine spoil heaps. *Ecological Research*, 30:1005-1014.
- Marquez-Gracia, B., Marquez, C., Sanjosé, I., Nieva, F.J.J., Rodriguez-Rubio, P. and Munoz-Rodriguez, A.F. (2013).** The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Marine Pollution Bulletin*, 70:119-124.
- Mathur, N., Singh, J., Bohra, S. and Vyas, A. (2007).** Arbuscular Mycorrhizal Status of Medicinal Halophytes in Saline Areas of Indian Thar Desert. *International Journal of Soil Science*, 2:119-127.
- Mayes, W. M., Younger, L. and Aumônier, J. (2008).** Hydrogeochemistry of Alkaline Steel Slag Leachates in the UK. *Water Air Soil Pollution*, 195:35-50.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N. and Cornejo, P. (2012).** Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42:741-775.
- Meier, S., Borie, F., Curaqueo, G., Bolan, N. and Cornejo, P. (2012).** Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. *Applied Soil Ecology*, 61:280-287.



- Melgar-Ramirez, R., Gonzalez, V., Sanchez, J.A. and Garcia, I. (2012).** Effects of application of organic and inorganic wastes for restoration of sulfur-mine soil. *Water Air Soil Pollution*, 223:6123-6131.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H., Gerits, J., Charles, P. and Van Gijsegem F (1985).** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162:328-334.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.P., Gawronski, S.W., Schröder, P. and Vangronsveld, J. (2010).** Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of soils and sediments*, 10:1039-1070.
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.P., Gawronski, S.W., Schröder, P., and Vangronsveld, J. (2010).** Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments*, 16:876-900.
- Mench, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Lepp, N.W. and Edwards, R. (2000).** *In situ* metal immobilisation and phytostabilisation of contaminated soils. N. Terry, G. Banuelos (Eds.), *Phytoremediation of contaminated soil and water*, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.
- Mendel, R.R. (2005).** Molybdenum: biological activity and metabolism, *Dalton transactions*, 21:3404-3409.
- Mendes, A.M.S., Duda, G.P., Araujo do Nascimento, C.W. and Silva (2006).** Bioavailability of cadmium and lead in a soil amended with phosphorus fertilizers. *Scientia Agricola*, 63:328-332.
- Mendez, M.O. and Maier, R.M. (2008).** Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments – An Emerging Remediation Technology. *Environmental health perspectives*, 116:278-283.
- Meuser, H. (2012).** Soil remediation and rehabilitation: treatment of contaminated and disturbed land (Vol. 23). *Springer Science and Business Media*.
- Milošević Nada, A., Marinković Jelena, B. and Tintor Branislava, B. (2012).** Mitigating abiotic stress in crop plants by microorganisms. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 123:17-26.
- Mishra, J., Singh, R. and Arora, N.K. (2017).** Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 8:1706.

- Moreira, H., Pereira, S. I., Marques, A. P., Rangel, A. O., & Castro, P. M. (2016).** Mine land valorization through energy maize production enhanced by the application of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Environmental Science and Pollution Research*, 23:6940-6950.
- Mot, A., Madjar, R., Badulescu, L. and Mihalache, M. (2019).** The effects of heavy metals on seed germination and seedling growth of *Lactuca sativa* L. and *Spinacia oleracea* L. *Research Journal of Agricultural Science*, 51(3):124-132.
- Moutte, J. (2009).** Arxim, a library for thermodynamic modeling of fluid-rock systems. <https://www.emse.fr/~moutte/arxim/> (site visited July 2020).
- Mulligan, C.N., Yong, R.N. and Gibbs, B.F. (2001).** Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 193-207.
- Myler, D.E. and Van Der Merwe, N.J. (1994).** Early Metal Working in Sub-Saharan Africa: A Review of Recent Research. *Journal of African History*, 35:1-36.
- Naidu, R. and Bolan, N.S. (2008).** Contaminant chemistry in soils : key concepts and bioavailability. *Developments in soil science*, 32:9-37.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Giacomo, P., Renella, G. and Valori, F. (2007).** Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ciencia del suelo*, 25:89-97.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T. Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G (2003) –** Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- Nautiyal, C.S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Letters*, 170:265-270.
- Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verma, D. (2000).** Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182:291-296.
- Nordstrom, D.K., Alpers, C.N., Ptacek, C.J. and Blowes, D.W. (2000).** Negative pH and Extremely Acidic Mine Waters from Iron Negative pH and Extremely Acidic Mine Waters from Iron Mountain, California Mountain, California. *US Geologica Survey*, 34:254-258.
- Nielsen, M.N. and Winding, A. (2002).** Microorganisms as indicators of soil health. *National Environmental research Institute, Denmark*, Technical Report No.388.
- Nriagu. J. O. (1989).** A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338:47-49.



- 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*, 311:1-3.
- Novo, L.A.B., Covelo, E.F. and Gonzalez, L. (2013).** The potential of *Salvia verbenaca* for phytoremediation of copper mine tailings amended with technosol and compost. *Water Air Soil Pollution*, 224:1513.
- Obata, H., Kawamura, S., Senoo, K. and Tanaka, A. (1999).** Changes in the level of protein and activity of Cu/Zn-superoxide dismutase in zinc deficient rice plant, *Oryza sativa* L. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45(4):891-896.
- Oburger, E., Cid, C.V., Preiner, J., Hu, J., Hann, S., Wanek, W. and Richter, A. (2018).** pH-Dependent Bioavailability, Speciation, and Phytotoxicity of Tungsten (W) in Soil Affect Growth and Molybdoenzyme Activity of Nodulated Soybeans. *Environmental Science and Technology*, 52:6146-6156.
- Oehl, F., Schneider, D., Sieverding, E. and Burga, C.A. (2011).** Succession of arbuscular mycorrhizal communities in the foreland of the retreating Morteratsch glacier in the Central Alps. *Pedobiologia*, 54:321-331.
- Orłowska, E., Orłowski, D. and Mesjasz-Przybyłowicz, J. (2010).** Role of Mycorrhizal Colonization in Plant Establishment on an Alkaline Gold Mine Tailing. *International Journal of Phytoremediation*, 13:185-205.
- Ostrowska, A. and Porebska, G. (2015).** Assessment of the C/N ratio as an indicator of the decomposability of organic matter in forest soils. *Ecological Indicators*, 49:104-109.
- Oustriere, N., Marchand, L., Bouchardon, J. L., Faure, O., Moutte, J. and Mench, M. (2016).** Aided phytostabilization of a trace element-contaminated technosol developed on steel mill wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 320:458-468.
- Outten, F.W. and Teil, C. (2009).** Iron-based redox swithces in biology. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Fudala, J., Strzelecka-Jastrzab, E., Hlawiczka, S., Panasiuk, D., Nitter, S., Pregger, T., Pfeiffer, H. and Friedrich, R (2007).** Current and future emissions of selected heavy metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe. *Atmospheric Environment*, 41:8557-8566.

- Padilla, F.M. and Pugnaire, F.I. (2006).** The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(4):196-202.
- Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y. and Montanarella, L. (2013).** Contaminated sites in Europe: Review of the current situation based on data collected through a European network. *Journal of Environmental and Public Health*.
- Pandia, O. Saracin, I., Dobrota, D., Danea-Christu, I. and Marin, G. (2016).** The management of steel industry in the context of durable development. *Annals of Faculty Engineering Hunedoara-International Journal of Engineering*, 14, 179-182.
- Partida-Martinez, L.P. and Heil, M. (2011).** The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science*, 2:100.
- Patten, C.L., and Glick, B.R. (2002).** Role of *Pseudomonas putida* Indole acetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3795-3801.
- Pechova, A. and Pavlata, L. (2007).** Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinarni Medicina*, 52:1-18.
- Pé-Leve Santos, S.C., Cruz, M.E., Barroso, A.M.E., Fonseca, C.P.S., Guerra, M., Carvalho, M.L. and Santos, J.P. (2013).** Elemental characterization of plants and soils in Panasqueira tungsten mining region. *Journal of Soils and Sediments*, 14 (4):778-784.
- Pereira, S.I.A, Barbosa, L., Castro, P.M.L. (2015).** Rhizobacteria isolated from a metal-polluted area enhance plant growth in zinc and cadmium contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12:2127-2142.
- Perreira, L.B., Vicentini, R., Ottoboni, L.M.M. (2014).** Changes in the Bacterial Community of Soil from a Neutral Mine Drainage Channel. *PLOS ONE*, 9(5).
- Pérez, M. and Urcelay, C. (2009).** Differential growth response to arbuscular mycorrhizal fungi and plant density in two wild plants belonging to contrasting functional types. *Mycorrhiza*, 19:517-523.
- Perez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V.E., Alabouvette, C. and Steinberg, C. (2006).** Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:460-470.
- Piatak, N.M., Parsons, M.B. and Seal, R.R. (2015).** Characteristics and environmental aspects of slag: A review. *Applied Geochemistry*, 57:236-266.
- Pichtel, J. and Anderson, M. (1997).** Trace metal bioavailability in municipal solid waste and sewage sludge composts. *Bioresource Technology*, 60:223-229.
- Pilon-Smits, E. (2005).** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56:15-39.

- Pirozynski, K.A. and Malloch, D.W. (1975).** The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems*, 6:153-164.
- Pratas, J., Prasad, M.N.V., Freitas, H. and Conde, L. (2005).** Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *Journal of Geochemical Exploration*, 85:99-107.
- Prieto, I., Violle, C., Barre, P., Durand, J.L., Ghesquiere, M. and Litrico, I. (2015).** Complementary effects of species and genetic diversity on productivity and stability of sown grasslands. *Nature Plants*, 1, 15033.
- Pronk, G.J., Heister, K., Vogel, C., Babin, D., Bachmann, J., Ding, G.C., Ditterich, F., Gerzabek, M.H., Giebler, J., Hemkemeyer, M., Kandeler, E., Mouvenchery, Y.K., Miltner, A., Poll, C., Schaumann, G.E., Smalla, K., Steinbach, A., Tanuwidjaja, I., Tebbe, C.C., Wick, L.Y., Woche, S.K., Totsche, K.U., Schlöter, M. and Kögel-Knaber, I. (2016).** Interaction of minerals, organic matter, and microorganisms during biochemical interface formation as shown by a series of artificial soil experiments. *Biology and Fertility of Soils*, 53:9-22.
- Pyle, D.M. and T.A. Mather (2003).** The importance of volcanic emissions for the global atmospheric mercury cycle. *Atmospheric Environment*, 37:5115-5124.
- Quin, B.F. and Brooks, R.R. (1974).** Tungsten concentrations in plants and soils as a mean of detecting scheelite-bearing ore-bodies in New Zealand. *Plant and Soil*, 41:177-188.
- R Core Team (2017).** R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rahman, A., Sitepu, I.R., Tang, S.Y. and Hashidoko, Y. (2010).** Salkowski's Reagent Test as a Primary Screening Index for Functionalities of Rhizobacteria Isolated from Wild Dipterocarp Saplings Growing Naturally on Medium-Strongly Acidic Tropical Peat Soil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(11):2202-2208.
- Rajkumar, M., Noriharu, A., Prasad, M.N.V. and Freitas, H. (2010).** Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28:142-149.
- Ramos da Silva, W., Vieira da Silva, F.B., Muniz Araujo, P.R. and Araujo do Nascimento, C.W. (2017).** Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144: 522-530.

- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and latif, F. (2004).** Organic Acids Production and Phosphates Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) Under in vitro Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2):187-196.
- Rauch, J.N. and Pacyna, M. (2009).** Earth's global Ag, Al, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn cycles. *Global biochemical cycles*, 23.
- Remon, E. (2006).** Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. *Thèse de doctorat. Université Jean-Monnet, Saint-Etienne*.
- Remon, E., Bouchardon, J.L., Le Guedard, M., Bessoule, J.J., Conord, C. and Faure O. (2013).** Are plants useful as accumulation indicators of metal bioavailability? *Environmental Pollution*, 175:1-7.
- Richards, J.P. and McDougall, I. (1990).** Geochronology of the Porgera gold deposit, Papua New Guinea: Resolving the effects of excess argon on K-Ar and  $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$  age estimates for magmatism and mineralization. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54:1397-1415.
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M. and Prigent-Combaret, C. (2009).** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321:305-339.
- Rillig, M.C. (2004).** Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, 84:355-363.
- Rillig, M.C. and Mummey, D.L. (2006).** Mycorrhizas and soil structure. *New phytologist*, 171:41-53.
- Roadcap, G. S., Walton, R. K. and Bethke, C. M. (2005).** Geochemistry of Extremely Alkaline (pH > 12) Ground Water in Slag-Fill Aquifers. *Ground Water*, 43:806-816.
- Ros, M., Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, M.T. and Insam, H. (2006).** Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:3443-3452.
- Roumet, C., Lafont, F., Sari, M., Warembourg, F. and Garnier, E. (2008).** Root traits and taxonomic affiliation of nine herbaceous species grown in glasshouse conditions. *Plant Soil*, 312:69-83.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R. and Fierer, N. (2010).** Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4:1340-1351.
- Sager, M. (2007).** Trace and nutrient elements in manure, dung and compost samples in Austria. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:1383-1390.

- Saison, C., Degrange, V., Olivier, R., Millard, P., Commeaux, C., Montange, D., Le Roux, X. (2006).** Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost borne microbial community. *Environmental Microbiology*, 8, 2.
- Saran, A., Imperato, V., Fernandez, L., Gkorezis, P., Haen, J., Merini, L.J., Vangronsveld, J. and Thijs, S. (2020).** Phytostabilization of polluted military soil supported by bioaugmentation with PGP-trace element tolerant bacteria isolated from *Helianthus petiolaris*. *Agronomy*, 10:204.
- Saxena, G., Marzinelli, E.M., Naing, N.N., He, Z., Liang, Y., Tom, L., Mitra, S., Ping, H., Joshi, U.M., Reuben, S., Mynampati, K.C., Mishra, S., Umashankar, S., Zhou, J., Andersen, G.L., Kjelleberg, S. and Swarup, S. (2015).** Ecogenomics Reveals Metals and Land-Use Pressures on Microbial Communities in the Waterways of a Megacity. *Environmental Science and Technology*, 49:1462-1471.
- Scattolin, M., Peuble, S., Pereira, F., Paran, F., Moutte, J., Menad, N., & Faure, O. (2020).** Aided-phytostabilization of steel slag dumps: The key-role of pH adjustment in decreasing chromium toxicity and improving manganese, phosphorus and zinc phytoavailability. *Journal of Hazardous Materials*, 124225.
- Ali, H. and Khan, E. (2018).** Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs–Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and ecological risk assessment: an International Journal*, 25(6):1353-1376.
- Scavo, A., Restuccia, A., Lombardo, S., Fontanazza, S., Abbate, C., Pandino, G., Anastasi, U., Onofri, A. and Mauromicale, G. (2020).** Improving soil health, weed management and nitrogen dynamics by *Trifolium subterraneum* cover cropping, *Agronomy for Sustainable Development*, 40:18.
- Schlegel, H.G, Cosson, J.P and Baker, A.J.M. (1991).** Nickel-hyperaccumulating plants provide a niche for nickel-resistant bacteria. *Botanica Acta*, 104:18-25.
- Schneider, J., Bundschuh, J. and Araujo do Nascimento, C.W. (2016).** Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site. *Science of total Environment*, 572:86-97.
- Schroeder, M.S. and Janos, D.P. (2004).** Plant growth, phosphorus nutrition, and root morphological responses to arbuscular mycorrhizas, phosphorus fertilization, and intraspecific density. *Mycorrhiza*, 15:203-216.

- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L. and Polle, A. (2001).** Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiology*, 127(3):887-898.
- Schwarz G., Hagedoorn PL., Fischer K. (2007).** Molybdate and Tungstate: Uptake, Homeostasis, Cofactors, and Enzymes. In: Nies D.H., Silver S. (eds) *Molecular Microbiology of Heavy Metals. Microbiology Monographs*, vol 6. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal of Biochemistry*, 160:47-56.
- Seguel, A., Cumming, J.R., Klugh-Stewart, K., Cornejo, P. and Borie, F. (2013).** The role of arbuscular mycorrhizas in decreasing aluminium phytotoxicity in acidic soils: a review. *Mycorrhiza*, 23:167-183.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A. and Harms, H. (2004).** Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental science and technology*, 38(12):228A – 231A.
- Sessitch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangrosveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K. and Puschenreiter, M. (2013).** The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 60:182-194.
- Shahid, M., Shashad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., Dumat, C. and Rashid, M. I. (2017).** Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*, 178:513-533.
- Sharma, M., Mishra, V., Rau ,N., RSH, S. (2011a).** Functionally diverse rhizobacteria of *Saccharum munja* (a native wild grass) colonizing abandoned morrum mine in Aravalli hills (Delhi). *Plant Soil*, 341:447–459.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. (2013).** Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2:1-14.
- Shen, C., Xiong, J., Zhang, H., Feng, Y., Lin, X., Li, X., Liang, W. and Chu, H. (2013).** Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biology and Biochemistry*, 57:204-211.
- Shen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. and Young, C.C. (2006).** Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34:33-41.



- Sheng, X.F., Xia, J.J., Jiang, C.Y., He, L.Y. and Qian, M. (2008).** Characterization of heavy metal resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*, 156:1164-1170.
- Sheoran, V., Sheoran, A.S. and Poonia, P. (2009).** Phytomining: a review, *Mineral Engineering*, 22:1007:1019.
- Sieh, D., Watanabe, M., Devers, E.A., Brueckner, F., Hoefgen, R. and Krajinski, F. (2013).** The arbuscular mycorrhizal symbiosis influences sulfur starvation responses of *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 197:606-616.
- Signh, H. P., Priyanka, M. Kaur, S., Batish, D. R. and Kohli, R. K. (2013).** Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters*, 11:229-254.
- Silva, A.M.D.S., Oliveira, E.C.A.D., Willadino, L.G., Freire, F.J. and Rocha, A.T.D. (2019).** Corrective phosphate application as a practice for reducing oxidative stress and increasing productivity in sugarcane. *Revista Ciência Agronômica*, 50(2), 188-196.
- Singh, R.K., Deshmukh, R., Muthamilarasan, M., Rani, R. and Prasad, M. (2020).** Versatile roles of aquaporins in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149:178-189.
- Singh, R., Glick, B.R., Rathore, D. (2018).** Biosurfactants as a Biological Tool to Increase Micronutrient Availability in Soil: A Review. *Pedosphere*, 28(2):170-189.
- Sinha, V., Pakshirajan, K. and Chaturvedi, R. (2018).** Chromium tolerance, bioaccumulation and localization in plants: An overview. *Journal of Environmental Management*, 206:715-730.
- Smith, J.L., Barrett, J.E., Tusnady, G., Rejto, L. and Cary, S.C. (2010).** Resolving environmental drivers of microbial community structure in Antarctic soils. *Antarctic Science*, 22(6):673-680.
- Smith, S.E. and Read, D.J. (2008).** Mycorrhizal Symbiosis. *Third edition. Academic Press, New York, New York, USA.*
- Smith, S.E., Smith, F.A. and Jakobsen, I. (2003).** Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. *Plant Physiology*, 133:16-20.
- Soti, P.G., Jayachandran, K., Koptur, S. and Volin, J.C. (2015).** Effect of soil pH on growth, nutrient uptake, and mycorrhizal colonization in exotic invasive *Lygodium microphyllum*. *Plant Ecology*, 216(7):989-998.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2011).** Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10.1101/cshperspect.a001438

- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31:425-448.
- Sprocati, A.R, Alisi, C., Tasso, F., Fiore, A., Marconi, P., Langella, F., Hafeburg, G., Nicoara, A., Neagoe, A. and Kothe, E. (2014).** Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 6824-6835.
- Stachowicz, J.J., Graham, M., Bracken, M.E.S. and Szoboszlai, A.I. (2008).** Diversity enhances cover and stability of seaweed assemblages: the role of heterogeneity and time. *Ecology*, 89(11):3008-3019.
- Stass, A., Wang, Y., Eticha, D. and Hors, W. J. (2006).** Aluminium rhizotoxicity in maize grown in solutions with  $\text{Al}^{3+}$  or  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  as predominant solution Al species. *Journal of Experimental Botany*, 57:4033-4042.
- Steidinger, B.S., Crowther, T.W., Liang, J., Van Nuland, M.E., Werner, G.D.A., Reich, P.B., Nabuurs, G.J., de-Miguel, S., Zhou, M., Picard, N., Herault, B., Zhao, X., Zhang, C., Routh, D., Peay, K.G. and GFBI consortium (2019).** Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature*, 569:404-408.
- Stephan, A., Meyer, A.H. and Schmid, B. (2000).** Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. *Journal of Ecology*, 88:988-998.
- Stiefel, E.I. (2002).** The biogeochemistry of molybdenum and tungsten. *Metals Ions in Biological System*, 39:1-29.
- Strigul, N., Koutsospyros, A., Christodoulatos, C. (2010).** Tungsten speciation and toxicity: Acute toxicity of mono- and poly- tungstates to fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73:164-171.
- Suvarapu L.N. and Baek, S.O. (2017).** Determination of heavy metals in the ambient atmosphere: A review. *Toxicology and Industrial Health*, 33:79-96.
- Sorensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. and Wuertz, S. (2005).** Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Review Microbiology*, 3:700-710.
- Tawaraya, K. (2003).** Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(5):655-668.
- Terpolilli, J.J., Hood, G.A. and Poole, P.S. (2012).** What Determines the Efficiency of  $\text{N}_2$ -fixing Rhizobium-Legume Symbioses ? *Advances in Microbial Physiology*, 60:325-389.



- Thijs S, Sillen W, Rineau F, Weyens N, Vangronsveld J. (2016).** Towards an enhanced understanding of plant–microbiome interactions to improve phytoremediation: engineering the metaorganism. *Frontiers in Microbiology*, 7:341.
- Tiwari, K.K., Dwivedi, S., Singh, N.K. Rai, U.N. and Tripathi, R.D. (2009).** Chromium (VI) induced phytotoxicity and oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.): Biochemical changes and translocation of essential nutrients. *Journal of Environmental Biology*, 30:389-394.
- Tomasic, M., Zgorelec, Z., Jurisic, A. and Kistic, I. (2013).** Cation Exchange Capacity of Dominant Soil Types in the Republic of Croatia. *Journal of Central European Agriculture*, 14(3):84-89.
- Treonis, A.M., Austin, E., Buyer, J.S., Maul, J.E., Spicer, L., Zasada, I.A. (2010).** Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Applied Soil Ecology*, 46:103-110.
- Trouvelot, A., Kough, J.L. and Gianinazzi-Pearson, V. (1986).** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche et méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (Eds), *Physiological and genetical aspects of mycorrhiza*. INRA Presse, Paris, 217-221.
- Tukey, J.W. (1977).** Exploratory data analysis. *Pearson, Ed.*, 712 pp.
- Tylecote, R.F. (2013).** A History Of Metallurgy. *Maney Publishing, Third edition*.
- Uchimiya, M., Wartelle, L.H., Klasson, K.T., Fortier, C.A. and Lima, I.M. (2011).** Influence of Pyrolysis Temperature on Biochar Property and Function as a Heavy Metal Sorbent in Soil. *Agricultural and Food Chemistry*, 59:2501-2510.
- Valls, M. et de Lorenzo, V. (2002).** Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:327-338.
- Vamerali, T., Bandiera, M. and Mosca, J. (2010).** Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8:1-17.
- Van Den Berg, G.A., Meijers, G.G.A., Van Der Heijdt, L.M. and Zwolsman, J.J.G. (2001).** Dredging-related mobilisation of trace metals: a case study in the Netherlands. *Water Resources*, 35:1979-1986.
- Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. and Van Straalen, N.M. (2008).** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and production in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 11:296-310.

- Van Der Heijden, M.G.A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, I., Boller, T., Wiemken, A. and Sanders, I.R. (2006).** The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172:739-752.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D. and Mench, M. (2009).** Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Sciences and Pollution Research*, 16:765-794.
- Verhoeven, J. and Pendray, A. (1998).** The mystery of Damascus Sword. *Muse*, 2:35-43.
- Visioli, G., Vamerali, T., Mattarozzi, M., Dramis, L., & Sanangelantoni, A. M. (2015).** Combined endophytic inoculants enhance nickel phytoextraction from serpentine soil in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Frontiers in plant science*, 6:638.
- Wahyudi, A.T. and Astuti, R.I. (2011).** Screening of *Pseudomonas* sp. Isolated from Rhizosphere of Soybean Plant as Plant Growth Promoter and Biocontrol Agent. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(1):134-141.
- Waldron, K.J. and Robinson, N.J. (2009).** How bacteria cells ensure that metalloproteins get the correct metal ? *Nature Review Microbiology*, 7:23-25.
- Wang, L., Bin, J., Yuehua, H., Runqing, L. and Sun, W. (2017).** A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 184:594-600.
- Wang, M., Ding, L., Gao, L., Li, Y., Shen, Q. and Guo, S. (2016).** The interactions of aquaporins and mineral nutrients in higher plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 17:1229.
- Wang, Q., Li, Y. and Klassen, W. (2005).** Determination of Cation Exchange Capacity on Low to Highly Calcareous Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36:1479-1498.
- Waswa, B.S., Vlek, P.L.G., Tamene, L.D., Okoth, P., Mbakaya, D. and Zingore, S. (2013).** Evaluating indicators of land degradation in smallholder farming systems of western Kenya. *Geoderma*, 195-196:192-200.
- Watts, D.B., Torbert, H.A. and Prior, S.A. (2010).** Long-Term Tillage and Poultry Litter Impacts Soil Carbon and Nitrogen Mineralization and Fertility. *Soil Fertility and Plant Nutrition*, 74(4).
- Wei, Y.L., Lin, C.Y., Cheng, S.H. and Wang, H.P. (2014).** Recycling steel-manufacturing slag and harbor sediment into construction materials. *Journal of hazardous Materials*, 265:253-260.

- Whitham, T.G., Young, W.P., Martinsen, G.D., Gehring, C.A., Schweitzer, J.A., Shuster, S.M., Wimp, G.M., Fischer, D.G., Bailey, J.K., Lindroth, R.L., Woolbright, S. and Kuske, C.R. (2003).** Community and Ecosystem Genetics: A Consequence of the Extended Phenotype. *Ecology*, 84(3):559-573.
- Whiting, S.N., de Souza, M.P. and Terry, N. (2001).** Rhizosphere Bacteria Mobilize Zn for Hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science and Technology*, 35:3144-3150.
- Winding, A., Hund-Rinke, K. and Rutgers, M. (2005).** The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and environmental safety*, 62:230-248.
- Withers, P.J.A., Tytherleigh, A.R.J. and O'Donnell, F.M. (1995).** Effect of sulphur fertilizers on the grain yield and sulphur content of cereals. *The Journal of Agricultural Science*, 125:317-324.
- Witt, M.L.I., Mather, T.A., Baker, A.R., De Hoog, J.C.M. and Pyle, D.M. (2010).** Atmospheric trace metals over the south-west Indian Ocean: Total gaseous mercury, aerosol trace metal concentrations and lead isotope ratios. *Marine Chemistry*, 121:2-16.
- World Steel Association (2018)** – Steel Statistical Yearbook. [www.worldsteel.org](http://www.worldsteel.org)
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., Wong, M.H. (2005).** Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1-2):155-166.
- Wu, S., Chen, B., Sun, Y., Ren, B., Zhang, X. and Wang, Y. (2014).** Chromium resistance of dandelion (*Taraxacum platyepidum* Diels.) and bermudagrass (*Cynodon dactylon* [Linn.] Pers.) is enhanced by arbuscular mycorrhiza in Cr(VI)-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9).
- Wu, S., Zhang, X., Chen, B., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., Sun, Y. and Wang, Y. (2016).** Transformation and Immobilization of Chromium by Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Revealed by SEM–EDS, TEM–EDS, and XAFS. *Environmental Science & Technology*, 49:14036-14047.
- Wu, S., Zhang, X., Sun, Y., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., Su, D., Lv, J., Li, G., Zhang, Z., Zheng, L., Zhang, J. and Chen, B. (2015).** Transformation and Immobilization of Chromium by Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Revealed by SEM–EDS, TEM–EDS, and XAFS. *Environmental Science & Technology*, 49:14036-14047.

- Yamasoe, M.A., Artaxo, P., Miguel, A.H. and Allen, A.G. (2000).** Chemical composition of aerosol particles from direct emissions of vegetation fires in the Amazon Basin: water-soluble species and trace elements. *Atmospheric Environment*, 34: 1641:1653.
- Yao, Y., Sun, H., Xu, F., Zhang, X. and Liu, S. (2010).** Comparative proteome analysis of metabolic changes by low phosphorus stress in two *Brassica napus* genotypes. *Planta*, 233:523-537.
- Yao, Z., Li, J., Xie, H. and Yu, C. (2012).** Review on Remediation Technologies of Soil Contaminated by Heavy Metals. *Procedia Environmental Sciences*, 16:722-729.
- Yi, H., Xu, G., Cheng, H., Wang, J., Wan, Y. and Chen, H. (2012).** An Overview of Utilization of Steel Slag. *Procedia Environmental Sciences*, 16:791-801.
- Yildirim, I.Z. and Prezzi, M. (2011).** Chemical, Mineralogical, and Morphological Properties of Steel Slag. *Advances in Civil Engineering*, 2011, 13 pp.
- You, R., Dominguez, C., Matamoros, V., Bayona, J.M. and Diez, S. (2019).** Chemical characterization and phytotoxicity assessment of peri-urban soils using seed germination and root elongation tests. *Environmental Science and Pollution Research*, 26:34401-34411.
- Yu, Q.H. (2018).** Metal Recovery from steelmaking slag. *Doctoral thesis, University of Toronto, Toronto*.
- Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y. and Engel, A.S. (2016).** The Relationship between pH and Bacterial Communities in a Single Karst Ecosystem and Its Implication or Soil Acidification. *Frontiers in Microbiology*, 7:1955.
- Zahoor, A. and Rehman, A. (2009).** Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environment Sciences*, 21:814-820.
- Zhang, W., Calvo-Polanco, M., Chi Chen, Z. and Zwiazek, J.J. (2013).** Growth and physiological responses of trembling aspen (*Populus tremuloides*), white spruce (*Picea glauca*) and tamarack (*Larix laricina*) seedlings to root zone pH. *Plant and Soil*, 373:775-786.
- Zhang, W. and Zwiazek, J.J. (2016a).** Responses of reclamation plants to high root zone pH: effects of phosphorus and calcium availability. *Journal of Environmental Quality*, 45:1652-1662.
- Zhang, W. and Zwiazek, J.J. (2016b).** Effects of root pH on root water transport and apoplastic pH in red-osier dogwood (*Cornus sericea*) and paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings. *Plant Biology*, 18:1001-1007.

- Zhang, X.H., Lin, A.J., Gao, Y.L., Reid, R.J., Wong, M.H. and Zhu, Y.G. (2009).** Arbuscular mycorrhizal colonisation increases copper binding capacity of root cell walls of *Oryza sativa L.* and reduces copper uptake. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:930-935.
- Zhao, R., Guo, W., Bi, N., Guo, J., Wang, L., Zhao, J. and Zhang, J. (2015).** Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays L.*) grown in two types of coal mine spoils under drought stress. *Applied Soil Ecology*, 88:41-49.
- Zhao, X., Lin, Q. and Li, B. (2003).** The relationship between rock phosphate solubilization and pH and organic acid production of microorganisms. *Journal of Microbiology*, 23:5-7.
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. (2008).** Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32:723-735.
- Zhu, G., Hezhong, T. and Hao, J. (2020).** Global anthropogenic atmospheric emission inventory of twelve typical hazardous trace elements, 1995-2012. *Atmospheric Environment*, 220.
- Zimmer, K., Zhang, Y., Lu, P., Chen, Y, Zhang, G., Dalkilic, M. and Zhu, C. (2016).** SUPCRTBL: A revised and extended thermodynamic dataset and software package of SUPCRT92. *Computers and Geosciences*, 90:97-111.
- Zornoza, R., Acosta, J.A., Martinez-Martinez, S., Faz, A. and Baath, E. (2015).** Main factors controlling microbial community structure and function after reclamation of a tailing pond with aided phytostabilization. *Geoderma*, 245-246:1-10.
- Zoroddu, M.A., Medici, S., Peana, M., Nurchi, V.M., Lachowicz, J.I., Laulicht-Glickc, F., Costa, M. (2018).** Tungsten or Wolfram: Friend or Foe ? *Current Medicinal Chemistry*, 25:65-74.

NNT : 2020LYSEM032

Mathieu Scattolin

## THE PHYTOSTABILIZATION OF STEEL SLAG : ROLE OF pH, MYCORRHIZAL FUNGI AND RHIZOSPHERIC BACTERIA

Speciality : Environmental engineering

Keywords : Phytomanagement; Toxic metals; Plant ionome; Bioaugmentation, Bioprospection

### Abstract :

Slag is waste generated by the metallurgical industries. They are artificial mineral materials particularly rich in metals. The ability of phytostabilization processes to reduce contaminant flows to surrounding environments is highly dependent on the efficient substrate colonization by plants. Thus, the sustainable installation of a plant cover on the technosols constituted by steel slag deposits requires the initiation of a pedogenesis favourable to its development and resilience. In this respect, the use of CSS (Composted Sludge Sewage) as an amendment is a promising approach. In addition to increase the substrate capacity to retain water and to provide the nutrients and organic matter essential for plant development, it allows the pH to be adjusted within a range that limits the mobility of toxic metallic elements, while increasing the mobility of essential macro and micro-nutrients. When this favourable pH range is reached ( $< 8.6$ ), the inoculation of the AMF *R. irregularis* strain (DAOM197198) improves plant nutrition quickly after implantation, particularly by lowering the pH of the substrate even more than by the addition of MIATE alone. Bioprospecting for PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) on phytostabilisation plots located on the study site led to the identification of strains potentially useful for carrying out projects to phytostabilize steel slag landfills. Further work would help to verify that these bacterial strains, inoculated alone or as consortium, actually promote long-term plant growth, their tolerance to the constraints encountered in this environment and thus the phytostabilization process. The extrapolation of the recommendations highlighted in this thesis works to the whole study slag heap could allow, by monitoring the development of vegetation and the living interactions taking place in the ecosystem, to study the ecological successions taking place on this terrain with very marginal characteristics.

NNT : 2020LYSEM032

Mathieu Scattolin

## LA PHYTOSTABILISATION DES LAITIERS D'ACIER : RÔLE DU pH, DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS ET DES BACTERIES RHIZOSPHERIQUES

Speciality : Environmental engineering

Clots clefs : Phytomanagement; Métaux toxiques; Ionome végétal; Bioaugmentation; Bioprospection

### Résumé :

Les laitiers sont des déchets générés par les industries métallurgiques. Il s'agit de matières minérales artificielles particulièrement riches en métaux. La capacité des procédés de phytostabilisation à réduire les flux de contaminants vers les environnements adjacents est fortement dépendante de l'efficacité avec laquelle le substrat est colonisé par les végétaux. Ainsi, l'installation durable d'un couvert végétal sur les technosols que constituent les dépôts de laitiers sidérurgiques nécessite l'initiation d'une pédogenèse favorable à son développement et à sa résilience. L'utilisation de MIATE (Matériaux d'intérêt agronomique issus du traitement des eaux) en tant qu'amendement constitue en cela une approche prometteuse. En dehors du fait qu'il confère au substrat la capacité de retenir l'eau tout en apportant les éléments nutritifs et la matière organique indispensable au développement des plantes, il permet d'ajuster le pH dans une gamme limitant la mobilité des éléments métalliques toxiques, tout en augmentant celle des macro et des micro-nutriments essentiels. Lorsque cette gamme de pH favorable est atteinte (< 8,6), l'inoculation de la souche d'AMF *R. irregularis* (DAOM197198) permet d'améliorer la nutrition des plantes rapidement après leur implantation, notamment en abaissant d'autant plus le pH du substrat que par apport de MIATE seul. La bioprospection de PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria : bactéries promotrices de la croissance végétale) sur des parcelles de phytostabilisation implantées sur le site d'étude a conduit à l'identification de souches potentiellement utiles pour la conduite de projets de végétalisation de décharges de laitiers d'acier. L'extrapolation des préconisations mises en évidence dans ces travaux de thèse à l'ensemble du terroir d'étude pourrait permettre, par le suivi du développement de la végétation et des interactions vivantes s'y déroulant, d'étudier les successions écologiques ayant cours sur ce terrain aux caractéristiques très marginales.