



HAL
open science

Revégétalisation et biodynamisation d'un terril de sous-produits industriels par le phytomanagement

Abdoulaye Mahamat Malabad

► **To cite this version:**

Abdoulaye Mahamat Malabad. Revégétalisation et biodynamisation d'un terril de sous-produits industriels par le phytomanagement. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCD051 . tel-04047041

HAL Id: tel-04047041

<https://theses.hal.science/tel-04047041>

Submitted on 27 Mar 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PRÉPARÉE A L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Ecole doctorale n° 554 « Environnements – Santé »

Doctorat de Sciences agronomiques et écologiques

Par

M. MALABAD Abdoulaye Mahamat

**Revégétalisation et biodynamisation d'un terril
de sous-produits industriels par le phytomanagement**

Thèse présentée et soutenue publiquement à Montbéliard, le 9 décembre 2022

Composition du Jury :

- Mme Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI** (Professeure, Université du Littoral Côte d'Opale), Présidente du jury
Mme LARUE Camille (Chargée de recherche HDR CNRS, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse), Rapporteur
Mme FABRE Sophie (Ingénieure de recherche HDR, Office National d'Etudes et de Recherches Aérospatiales), Rapporteur
M. COLIN Jean-Michel (Directeur d'études, TRONOX THANN France), Examineur
M. CHALOT Michel (Professeur, Université Bourgogne Franche-Comté), Directeur de thèse
M. PARELLE Julien (Maître de conférences, Université Bourgogne Franche-Comté), Codirecteur de thèse
Mme TATIN-FROUX Fabienne (Maîtresse de conférences, Université Bourgogne Franche-Comté), Invitée

Dédicaces

Ce modeste travail de thèse de doctorat est dédié

A mon père, l'exemple de dévouement ;

A ma mère, la source de tendresse ;

A ma chère épouse et mon fils ;

A mes sœurs et mes frères ;

A l'ensemble de la famille ;

Et à mes amis.

Malabad

Remerciements

Louange au Tout Miséricordieux Qui m'a donné le courage, la patience, et la force, Qui m'a éclairé la voie de la science, et Qui par Sa grâce j'ai réussi à achever ce travail de thèse. Au terme de cette merveilleuse aventure de 2018 à 2022, jalonnée des petites victoires personnelles, permettez-moi d'exprimer ici mes sincères remerciements à toutes celles et ceux envers qui je me reconnais redevable. Sans vos soutiens et participations, ce travail n'aurait pas vu le jour. Sachez qu'aucun mot ne peut exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.

Je souhaite tout d'abord remercier mes directeurs de thèse : Professeur Michel CHALOT et Docteur Julien PARELLE. Merci Michel pour cet honneur d'un encadrement scientifique et pédagogique accompli. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et la confiance que tu m'as accordée durant la réalisation de ce travail de thèse. Auprès de toi, j'ai appris que seul le travail bien fait paye. Julien, je te remercie aussi beaucoup pour ta disponibilité, ton soutien et ton aide tout au long de cette thèse. Docteur Fabienne TATIN-FROUX, même si tu ne figures pas officiellement parmi mes directeurs de thèse, tu as toujours été de la partie. Merci pour ta bienveillance, ton intelligence, et ta force sur le terrain.

Je tiens également à remercier vivement les membres du jury de ma soutenance : Pr. Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI, Dr. Camille LARUE, Dr. Sophie FABRE, et Dr. Jean-Michel COLIN, pour avoir accepté d'évaluer ce travail me permettant ainsi de disposer de leurs expertises. Ensuite, Je tiens à remercier les membres de mon comité scientifique de suivi de thèse : Dr. Damien BLAUDEZ, et Dr. Catherine LLANES qui m'ont conseillé et apporté un avis extérieur sur mon travail.

Je remercie beaucoup Gilles GALLINET de m'avoir initié dans le monde de la télédétection. Dans le cadre de cette thèse, j'ai eu aussi la chance d'enseigner, je remercie Coralie BERTHEAU, Fabien BORDERIE et Guillaume BERTRAND pour m'avoir accompagné dans cette tâche. Je témoigne également ici toute ma gratitude à l'ensemble des chercheurs et personnels de Laboratoire Chrono-environnement (UMR 6249 UFC-CNRS) et plus particulièrement à Philippe BINET, Stéphane PFENDLER, Lisa CIADAMIDARO, Loïc YUNG, Cyril ZAPPELINI, Régine GSCHWIND, Pierre-Emmanuel LENI, Valentin LAGEDAMON, Jun ZHOU, Benoit VALOT, Nadia CRINI, Caroline AMIOT, Alexandre LHOSMOT, Guillaume FOURSOV, José ZAPATA, Nadine BERNARD, et Gudrun BORNETTE. Merci pour vos soutiens qui m'ont été précieux d'une manière ou d'une autre afin de mener à bien ce travail. Marie Laure TOUSSAINT, tu es une chance pour nous au labo, reçois mes vifs remerciements pour toute ton aide au quotidien.

Vers la fin de ma thèse, j'ai eu la chance de partager le bureau et de bons moments avec Chloé VIOTTI, Jordan COLLOT, Danijela ARSENOV. Merci pour la bonne ambiance au sein et en dehors du labo. Tristan COURAUD et SALMON Hugo, je ne vous oublie pas car vous faites partie de la Team. Je tiens aussi à remercier l'équipe de stagiaires que j'ai eu à encadrer durant ma thèse. Adrien CELIER, Clément LOBREAU, Kellian DUARTE, Rémi FORET, Louis GROELLY, et Alexandra BARTHOD, merci pour vos participations à mon projet de thèse.

Je tiens aussi à remercier Pays de Montbéliard Agglomération (PMA) pour le soutien financier qui m'a permis de terminer la thèse dans des bonnes conditions. Mes sentiments de remerciements aussi chaleureux qu'affectueux vont à l'endroit des élus et des habitants de l'agglomération et de l'aire urbaine Belfort Montbéliard, pour leurs soutiens sur tout le plan sans lesquels rien n'aurait été possible. Magali GOUTHROT, Mohamed AMZIL, Danielle PHEULPIN, Michel PHEULPIN, Rachel TODJINAN, Apollinaire TODJINAN, Laurent FEUILLET, merci à vous toutes et tous pour le temps consacré à mon écoute. Vos assistances, ô combien immense, m'ont permis de passer avec aisance mes années à Montbéliard. Adoum Sinine, Sonia, Muhammad, Ghislain, Pape Moussa, Axel, merci à vous les amis pour le soutien et l'encouragement depuis le début de cette belle aventure. Je vous souhaite une bonne continuation.

Chers parents Hadjé Haoua Mahamat Hassan & Abdoulaye Mahamad Malabad, aucun hommage ne saurait exprimer la grandeur de mon amour, mon estime, et ma profonde reconnaissance pour les sacrifices et les efforts consentis pour moi, ce modeste travail vous y est dédié. Merci !

Enfin, à tous ceux dont l'amitié, la fraternité et la bienveillance n'ont cessé d'être pour moi un soutien et une affection, qui m'ont aidé à franchir diverses étapes de la vie, je leur adresse des chaleureux remerciements.

Résumé

Les activités industrielles peuvent produire d'énormes quantités des sous-produits résiduels comme le gypse rouge issus de la production de TiO_2 , qui présentent des conditions physico-chimiques défavorables à la croissance des plantes, notamment des concentrations élevées en éléments traces métalliques, une faible teneur en nutriments, un pH élevé et une pauvre diversité microbienne. ***L'objectif applicatif de ce projet de thèse était donc de proposer des pistes pour la revitalisation d'un terribil de sous-produits industriels issue de l'usine TRONOX France, par la mise en œuvre d'une démarche de revégétalisation et biodynamisation. L'objectif scientifique général était alors la recherche d'une combinaison optimale « substrat / amendement / espèce végétale » pour favoriser les conditions d'une meilleure revégétalisation.*** Ce travail de phytomanagement, à partir de plusieurs approches transdisciplinaires (l'écophysiologie végétale, l'agronomie, la télédétection, et la microbiologie), combine des essais *in-situ* et des expériences en mésocosme au laboratoire afin de répondre aux différents enjeux du site et objectifs scientifiques spécifiques. Nous avons d'abord testé la biodynamisation du substrat par des amendements organique (digestat) et biologique (inoculum bactérien) pour favoriser la phytostabilisation des ETM. Le digestat a amélioré les fonctionnalités du sol évaluées à partir des activités enzymatiques, et augmenté significativement la biomasse de *Betula pendula*. Le digestat a aussi augmenté la teneur en nutriment P et K des feuilles, et a diminué en revanche la teneur en ETM notamment Fe, Mn et Zn des feuilles. Ensuite, nous avons évalué la capacité de transpiration des 16 espèces végétales afin de pouvoir accroître le potentiel d'évapotranspiration sur le site d'Ochsenfeld. *Ostrya carpinifolia* a été l'espèce qui combine les valeurs les plus élevées de la croissance, de l'absorption de Mn, et de la conductance de la canopée déduite de la conductance stomatique et de LAI obtenue à l'aide de la télédétection par drone. Enfin, nous avons étudié les caractéristiques fonctionnelles et protéogénomiques d'un isolat de *Pseudomonas sp* à haute capacité de solubilisation de Mn, pour mieux comprendre les mécanismes de transfert de Mn dans le continuum sol-plantes. Finalement, l'amendement de gypse rouge par le digestat et des isolats bactériens capables de solubiliser le Mn pourrait être proposé comme une stratégie efficace pour la revégétalisation des terrils par *Ostrya carpinifolia* et d'autres espèces d'arbres tolérantes, dans une approche de phytomanagement.

Mots clés : Eléments traces, Manganèse, Terril de gypse rouge, Phytostabilisation, Digestat, *Pseudomonas sp*, Télédétection par drone, Transpiration, *Ostrya carpinifolia*, *Betula pendula*.

Abstract

Industrial activities can produce huge quantities of residual by-products such as red gypsum from TiO₂ production, which present unfavorable physico-chemical conditions for plant growth, including high concentrations of trace elements, low nutrient content, high pH and poor microbial diversity. ***The application objective of this thesis project was therefore to propose ways to revitalize a landfill of industrial by-products from the TRONOX France plant, by implementing a revegetation and biodynamisation approach. The general scientific objective was the search for an optimal combination of “substrate / amendment / plant species” to promote the conditions to better revegetation.*** This phytomanagement study, based on several transdisciplinary approaches (plant ecophysiology, agronomy, remote sensing, and microbiology), combines *in-situ* essay and mesocosm experiments in laboratory in order to address the different site issues and specific scientific objectives. We first tested the biodynamisation of the substrate with organic (digestate) and biological (bacterial inoculum) amendments to promote phytostabilisation of TE. The digestate had improved soil functionalities assessed from enzymatic activities, and significantly increased the biomass of *Betula pendula*. The digestate also increased the P and K nutrient content of the leaves, while decreasing the content of TE such as Fe, Mn and Zn in the leaves. Next, we evaluated the transpiration capacity of the 16 plant species in order to increase the evapotranspiration potential at the Ochsenfeld site. *Ostrya carpinifolia* was the species that combined the highest values of growth, Mn uptake, and canopy conductance deduced from stomatal conductance and LAI obtained using UAV remote sensing. Finally, we investigated the functional and proteogenomic characteristics of a *Pseudomonas sp* isolate with high Mn-solubilisation capacity, to better understand the mechanisms of Mn transfer in the soil-plant continuum. Therefore, the amendment of red gypsum with digestate and bacterial isolates capable of solubilising Mn could be proposed as an effective strategy for revegetation of landfills by *Ostrya carpinifolia* and other tolerant tree species, in a phytomanagement approach.

Keywords: Trace elements, Manganese, Red gypsum landfill, Phytostabilisation, Digestate, *Pseudomonas sp*, UAV remote sensing, Transpiration, *Ostrya carpinifolia*, *Betula pendula*.

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements	II
Résumé	V
Abstract	VII
Table des matières	IX
Abréviations	XII
Liste des figures	XIII
Liste des tableaux	XVI
Fiche présentative de la thèse	XVII
Valorisation scientifique	XXI
Contexte de la thèse.....	2
1 Synthèse bibliographique	6
1.1 SSP en France	7
1.2 Mobilité et transfert des ETM	12
1.2.1 Transfert d'ETM dans le continuum sol-eau-atmosphère.....	12
1.2.2 Biodisponibilité des ETM	13
1.2.3 Transfert d'ETM dans le système sol-plantes	15
1.2.4 Transpiration et translocation des ETM	18
1.2.4.1 Généralités.....	18
1.2.4.2 Lien entre le flux d'eau et le transfert des ETM.....	20
1.2.5 Effets des ETM sur les végétaux	22
1.3 Revégétalisation des SSP.....	25
1.3.1 Phytomanagement / Phytostabilisation	25
1.3.2 Phytostabilisation aidée / Biodynamisation	29
1.3.2.1 Les amendements organiques.....	29
1.3.2.2 Les amendements biologiques	34
1.3.2.3 Approches « omiques » pour le phytomanagement des SSP	39
1.3.2.4 Autres stratégies pour biodynamiser les SSP.....	41
1.3.3 Suivi de la végétation par télédétection.....	42

1.3.3.1 Généralités.....	42
1.3.3.2 Utilisation des indices de végétation.....	46
1.3.4 Cas particulier des sites liés à l'industrie minière.....	50
1.3.4.1 Généralités.....	50
1.3.4.2 Production du dioxyde de titane.....	50
1.3.4.3 Gypse rouge issue de la production de TiO ₂	54
1.3.4.4 Boue rouge issue de la production d'Al.....	56
2 Objectifs du travail de thèse.....	62
3 Matériels et Méthodes.....	66
3.1 Site d'études.....	66
3.2 Matériel végétal.....	68
3.3 Méthodes analytiques.....	69
3.3.1 Mesures écophysiologicals.....	69
3.3.2 Analyse par télédétection.....	71
3.3.3 Préparation des échantillons et dosage des ETM.....	73
3.3.4 Analyse microbiologique.....	74
3.4 Analyses statistiques.....	78
4 Résultats.....	80
4.1 Chapitre I. Déterminer l'amendement qui pourrait améliorer la production végétale et augmenter la capacité de stabilisation ou d'accumulation des ETM.....	81
4.1.1 Contexte de la publication I.....	81
4.1.2 Publication I.....	83
I.1. Introduction.....	85
I.2. Materials and methods.....	87
I.3. Results.....	92
I.4. Discussion.....	101
I.5. Conclusions.....	105
4.2 Chapitre II. Evaluer la capacité de transpiration des différentes espèces d'arbres capable de pousser sur le gypse rouge.....	113
4.2.1 Contexte de la publication II.....	113
4.2.2 Publication II.....	115
II.1. Introduction.....	117

II.2. Materials and methods.....	120
II.3. Results	126
II.4. Discussion.....	132
II.5. Conclusions	138
4.3 Chapitre III. Etudier la souche <i>Pseudomonas sp.</i> , isolée sur le site d’Ochsenfeld, capable de solubiliser le Mn, et donc faciliter son transfert vers la plante.	151
4.3.1 Contexte de la publication III.....	151
4.3.2 Publication III.....	153
III.1. Introduction	155
III.2. Experimental procedures	157
III.3. Results and discussion.....	160
5 Discussion, conclusions et perspectives	172
Annexes	B
Références bibliographiques	F

Abréviations

Abréviation	Désignation complète
ARVI	Atmospherically Resistant Vegetation Index (Indice de végétation résistant à l'atmosphère)
BASIAS	BASe de données sur l'historique des sites Industriels et Activités en Service
BASOL	BAse de données sur les sites et SOLs pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif
CASIAS	Carte des Anciens Sites Industriels et Activités de Services
CCI	Chlorophyll Content Index
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
DVI	Difference Vegetation Index (Indice différentiel de végétation)
E	Transpiration foliaire
ETM	Eléments Traces Métalliques ou Métalloïdes
FPGN	Fond Pédo-Géochimique Naturel
g_s	Conductance stomatique pour la vapeur d'eau
GSD	Ground Sample Distance (Distance d'échantillonnage au sol)
LAI	Leaf Area Index (Indice de surface foliaire)
MNC	Modèle Numérique de Canopée
MNS	Modèle Numérique de Surface
MNT	Modèle Numérique de Terrain
NDVI	Normalized Difference Vegetation Index (Indice de végétation de différence normalisée)
NIR	Near Infra-Red (proche infrarouge)
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes)
RVI	Ratio Vegetation Index (Indice de végétation par quotient)
SAVI	Soil-Adjusted Vegetation Index (Indice de végétation ajusté pour le sol)
SSP	Sites et Sols Pollués
SWIR	Short-Wave Infra-Red (infrarouge à ondes courtes)
Ψ_{base}	Potentiel hydrique de base
Ψ_{feuille}	Potentiel hydrique foliaire
Ψ_{min}	Potentiel hydrique minimum
$\Psi_{\text{xylème}}$	Potentiel hydrique de xylème

Liste des figures

Figure 1 : Densité des sites potentiellement contaminés par 1 000 habitants dans 33 pays européens (Panagos et al., 2013).	8
Figure 2 : Distribution des contaminants affectant le sol européen (Panagos et al., 2013).	8
Figure 3 : les sites et sols pollués en France (MTES, 2015)	9
Figure 4 : Nombre de sites et sols pollués par région en France (MTES/DGPR, BASOL au 4 juillet 2018)	10
Figure 5 : Poids global des 7 familles de polluants identifiés dans les sols français (MTES/DGPR, BASOL au 4 juillet 2018).....	10
Figure 6 : Schéma récapitulant les transferts possibles d'ETM entre les différents compartiments dans le cadre d'une activité minière (adaptée de Goix, 2012).	13
Figure 7 : Différentes réponses des végétaux à l'accroissement de la quantité des ETM dans le sol (adaptée de Robinson et al., 2009).	17
Figure 8 : Voies de circulation de l'eau dans la plante et illustration de la théorie de tension-cohésion (Biology OpenStax, 2018).	20
Figure 9 : Transport par le xylème et le phloème dans la plante intacte (Page and Feller, 2015).	21
Figure 10 : Toxicité des ETM (nommé HM) chez les plantes et leurs stratégies de tolérance (absorption/translocation et détoxification) (Nedjimi, 2021).....	24
Figure 11 : Principales techniques de phytomanagement des ETM (adapté de DalCorso et al., 2019).....	26
Figure 12 : Illustration des effets potentiels de la phytostabilisation sur des sols contaminés par des ETM (adapté de (Bolan et al., 2011))	26
Figure 13 : Essais de phytostabilisation d'une lagune de stockage de sous-produits industriels, avec production de biomasse valorisable, site de Tavaux – SOLVAY (Chalot, données non publiées).	28
Figure 14 : Impact du digestat sur la germination des graines après 10 jours de semis et la biomasse aérienne de blé après 24 jours de semis (Tayibi et al., 2021).....	31
Figure 15 : A. Biomasses sèches et B. hauteur de <i>Solanum lycopersicum</i> avec différents traitements durant trois mois (Cristina et al., 2020).	32
Figure 16 : Respiration microbienne dans des sols amendés avec du digestat (Gielnik et al., 2019).....	33
Figure 17 : Les mécanismes de promotion de la croissance des plantes par les microorganismes.	34

Figure 18 : Effet de l'inoculation de <i>Pseudomonas libensis</i> (TR1) et de <i>Pseudomonas reactans</i> (Ph3R3) ou sans inoculation (Blank) sur la masse sèche de <i>Brassica oxyrrhina</i> (Ma et al., 2016)	35
Figure 19 : Mécanismes microbiens et végétaux pour augmenter la disponibilité du Mn dans la rhizosphère (Rengel and Marschner, 2005).	37
Figure 20 : Approches « omiques » (Dalal et al., 2020).	40
Figure 21 : Le concept de protéogénomique (Nesvizhskii, 2014).	41
Figure 22 : Télédétection passive et active (O'Connor, 2014).	44
Figure 23 : Le spectre de réflectance de la végétation verte (Elowitz, 2014).	46
Figure 24 : Exemple des réflectances de la végétation (Evangelides and Nobajas, 2020)	49
Figure 25 : Volume de production de minerais de Ti par pays et dans le monde en 2016, en milliers de tonnes d'équivalent TiO ₂ (Statista Research Department, 2018).	52
Figure 26 : Les deux procédés de production de TiO ₂ (Guichon, 2022).	53
Figure 27 : Paysage formé de gypse rouge sur le terrib d'Ochsenfeld issue de l'usine TRONOX Thann, France (IGN Géoportail, 2018).	54
Figure 28 : Terrib de gypse rouge issue de l'usine d'extraction de Ti basée à Nguluku Maumba, Kwale Kenya (Business Daily, 2016).	55
Figure 29 : Rupture de digues du bassin contenant la boue rouge causant l'inondation de la zone environnante à Ajka en Hongrie.	57
Figure 30 : Site de Mange-Garri de Bouc-Bel-Air dédié au stockage de boues rouges issues de l'usine Alteo de Gardanne.	58
Figure 31 : Activités enzymatiques microbiennes du sol: (a) déshydrogénase et (b) beta-glucosidase, sur 4 quatre sites pour chaque saison. Site A (non réhabilité), site B (1 an), site C (10 ans) et site D (12 ans).	58
Figure 32 : Évolution de la végétalisation de bassin de résidus de bauxite à Kirkvine en Jamaïque (Evans, 2016)	59
Figure 33 : Schéma conceptuel représentant les trois objectifs de la thèse.	63
Figure 34 : Vue aérienne du site d'Ochsenfeld, la parcelle D1 en jaune et la parcelle PROLIPHYT en bleu (IGN Géoportail, 2018).	67
Figure 35 : Parcelle expérimentale avec les 18 espèces d'arbres plantées dans le cadre du Projet PROLIPHYT A. vue aérienne de la plantation formée de 8 lots identiques acquise par drone, B. disposition des espèces ligneuses d'un lot.	68
Figure 36 : Parcelle PROLIPHYT, site d'Ochsenfeld A. bande visible et B. bande NIR	72
Figure 37 : Estimation de la hauteur des arbres à l'aide du MNC obtenu en soustrayant le MNT du MNS (Bonnet et al., 2011).	73
Figure 38 : Environnement de travail de la plateforme Galaxy	78

Figure 39 : Schéma explicatif du contexte et objectifs de la thèse, du site d'études et ses problématiques et enjeux, et des faits marquants de l'ensemble de ces travaux..... 172

Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneurs totales en ETM dans des sols français (Baize, 2000)	13
Tableau 2 : Solutions d'extraction utilisées pour estimer la biodisponibilité des ETM dans le sol (adopté d'après Harmsen, 2007)	14
Tableau 3 : Influence du couvert végétal sur la vitesse du vent au sol, l'envolée de poussières et les flux d'arsenic sur le site de Salsigne.....	27
Tableau 4 : Dose maximale préconisée pour les amendements organiques (NF U 44-051, 2010).	30
Tableau 5 : Principaux métaux et minéraux industriels produits par l'industrie minière (Cooke et Johnson, 2002).....	50
Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques générales du titane (Ti).	51
Tableau 7 : Propriétés d'ilménite et de rutile (Whitehead, J. 1983).....	52
Tableau 8 : Composition du gypse rouge (Peacock and Rimmer, 2000).	55
Tableau 9 : Composition typique de la boue rouge (Khairul et al., 2019).	57
Tableau 10 : Distribution granulométrique et caractéristiques physico-chimiques du gypse rouge (n=6). Corg : carbone organique ; M O : matière organique ; Ntot : azote total ; C/ N : rapport carbone sur azote ; CEC : capacité d'échange cationique.	67
Tableau 11 : Teneurs en ETM total et extractible au CaCl ₂ du gypse rouge (mg/kg MS) (n=5) (Assad et al., 2017). Les données inférieures à la limite de quantification sont indiquées par la mention < LQ et les données non déterminées par ND.....	67
Tableau 12 : Liste des différentes espèces ligneuses plantées sur le site d'Ochsenfeld dans le cadre du projet PROLIPHYT.	69
Tableau 13 : Caractéristiques fonctionnelles des isolats utilisés (Zappelini et al., 2018).....	75
Tableau 14 : Les différents activités enzymatiques étudiées	76

Fiche présentative de la thèse

- **NOM et Prénom de l'auteur** : M. MALABAD Abdoulaye Mahamat.
- **Intitulé du travail** : Revégétalisation et biodynamisation d'un terroir de sous-produits industriels par le phytomanagement.
- **Direction de thèse** : M. CHALOT Michel, Professeur, Laboratoire Chrono-environnement UMR 6249 CNRS - Université Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France.
- **Codirection de thèse** : M. PARELLE Julien, Maître de conférences, Laboratoire Chrono-environnement UMR 6249 CNRS - Université Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon cedex, France.
- **Période de réalisation du travail de thèse** : du 5 novembre 2018 au 9 décembre 2022.
- **Lieu de travail** : Laboratoire chrono-environnement (site de Montbéliard principalement et site de La Bouloie à Besançon secondairement) + terrain d'études à Thann (site d'Ochsenfeld).
- **Inscription** : doctorat de Sciences agronomiques et écologiques ; Ecole doctorale n° 554 « Environnements-Santé », Université Bourgogne Franche Comté. Section CNU "66 - Physiologie", "67 - Biologie des populations et écologie", "68 - Biologie des organismes".
- **Membres du comité scientifique de suivi de thèse** :
 - ✚ M. Damien BLAUDEZ, Maître de conférences HDR, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux UMR 7360 CNRS - Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.
 - ✚ Mme Catherine LLANES, Maître de conférences HDR, Laboratoire Chrono-environnement, UMR 6249 CNRS - Université Bourgogne Franche-Comté, Boulevard A. Fleming 25030 Besançon cedex, France.
- **Référente de l'école doctorale responsable du suivi individuel « Marraine »** : Mme Corine GIRARD, Professeure, Pôle Substances Naturelles, EA 4267 PEPITE, UFR des Sciences de la Santé, 19 rue Ambroise Paré - Bâtiment Socrate, 25030 Besançon Cedex, France.

- Rapporteuses de la thèse :

- ✚ Mme LARUE Camille, Chargée de recherche HDR CNRS, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Campus ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole - BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France.
- ✚ Mme Sophie FABRE, Ingénieure de recherche HDR, Office National d'Etudes et de Recherches Aérospatiales, ONERA - The French Aerospace Lab, Département optique et techniques associées, 2 Avenue Edouard Belin - BP 74025, 31055 Toulouse, France.

- Examineurs de la thèse :

- ✚ Mme Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI, Professeure, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, Université du Littoral Côte d'Opale, 50 Rue Ferdinand Buisson, 62228 Calais, France.
- ✚ M. Jean-Michel COLIN, Directeur d'études, pôle environnement, TRONOX France, 95 Rue du General De Gaulle, 68800 Thann, France.

- Invitée lors de la soutenance :

- ✚ Mme TATIN-FROUX Fabienne, Maîtresse de conférences, Laboratoire Chrono-environnement UMR 6249 CNRS - Université Bourgogne Franche-Comté, 16 route de Grey, 25030 Besançon cedex, France.

- Cadres de financement ou de coopération :

- ✚ CDD de 12 mois, UFR STGI - Université de Franche Comté (Financement : convention Pays de Montbéliard Agglomération)
- ✚ Bourse du gouvernement tchadien (2018), Direction des études, de la planification, et de l'orientation des bourses – Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation [561 PR/MESRI/SG/DGCNOU/SEPOB/ 2018]
- ✚ Projet ADEME PROLIPHYT 1172C0053 (2013-2018) Programme Eco-Industries
- ✚ Projet ANR PHYTOCHEM [ANR-13-CDII-0005-01] (2013-2018)
- ✚ Projet ADEME PHYTOFIBER (2017-2021) Programme GRAINES 2017

- Encadrement de stage réalisés durant la thèse :

En tant que personne-ressource :

- ✚ Léa BUISSON, Emile MAILLET, Hugo MALGRATI, *Master Géologie Appliquée, 2^e année - Université de Franche Comté, Projet Tuteuré (promotion 2019-2020)*. « Projet de revégétalisation d'un terroir des sous-produits d'extraction de Titane ; réalisation de panneaux électriques ».

En tant que tuteur de stage :

- ✚ Adrien CELIER, *Master Microbiologie 1^{ère} année – Université de Lorraine, du 12 avril au 04 juin 2021*. « Caractérisation d'une souche bactérienne isolée d'un site de dépôt de gypse rouge et réduisant les oxydes de manganèse ».
- ✚ Clément LOBREAU, *Licence Biologie / Ecologie, 3^e année – Université de Franche Comté, 4 semaines (du 06 avril au 30 avril 2021)*. « Suivi écophysio-logique de bouleaux poussant sur différents types d'amendement, utilisés pour biodynamiser et végétaliser une friche industrielle ».
- ✚ Kellian DUARTE, *BTS Biotechnologies 2^e année – Lycée Lumière de Luxeuil-les-Bains, 8 semaines (du 04/01/2021 au 26/02/2021)*. « Caractérisation fonctionnelle de souches bactériennes isolées sur un site industriel ».
- ✚ Rémi FORET, *BTS Biotechnologies 2^e année – Lycée Lumière de Luxeuil-les-Bains, 8 semaines (du 06/01/2020 au 28/02/2020)*. « Caractérisation fonctionnelle de souches bactériennes isolées d'une lagune de stockage de sous-produits industriels ».
- ✚ Louis GROELLY, *Licence Sciences de la Vie et de l'Environnement, 3^e année – Université de Franche Comté, 5 semaines (du 13 janvier au 14 février 2020)*. « Effet de biofertilisant sur la croissance et la physiologie de *Betula pendula* sur terroir de sous-produits industriels ».
- ✚ Alexandra BARTHOD, *Master Microbiologie 1^{ère} année – Université de Lorraine, du 8 avril au 29 mai 2019*. « Caractérisation fonctionnelle de souches de bactéries isolées d'une lagune de stockage de sous-produits industriels ».

- Commissions :

- + Représentant des doctorants au sein du conseil de l'Ecole Doctorale ED n° 554 "Environnements-Santé" (du 25 mars 2019 au 25 décembre 2021)
- + Participation au jury du concours pour les contrats doctoraux de l'ED ES :
 - Dijon, du 30 juin au 2 juillet 2020
 - Besançon, du 2 juillet 2019 au 4 juillet 2019

- Vacations dans l'enseignement à l'UFR STGI – UFC (Année 2019-2020) :

- + UE Biologie cellulaire Organisation cellules eucaryotes, Licence 1 SVE (30 heures)
- + UE La Terre et l'Univers depuis le Big-Bang, Licence 1 (22 heures)
- + UE Droit, acteurs et économie de l'Environnement, Master 1 (12 heures)

- Catégories des formations suivies durant la thèse

- + Connaissances et outils d'enseignement : 32 h
- + Conférence Ethique de la recherche et intégrité scientifique : 9 h
- + Formation documentaire : 18 h
- + Formations à la recherche : 44 h
- + Hygiène et sécurité : 7 h
- + Informatique et modélisation scientifique : 30 h
- + Langues (Anglais scientifique) : 18 h
- + Management et entrepreneuriat : 7 h
- + Poursuite de carrière : 12 h

Total de participation : 177 heures

Valorisation scientifique

Ce présent travail de thèse a donné lieu aux résultats suivants :

Liste de publications à comité de relecture :

Manuscrit et statut	Références
Manuscrit 1 Publié.	Malabad, A.M. , Zapata-Carbonell, J., Maurice, N., Ciadamidaro, L., Pfendler, S., Tatin-Froux, F., Ferrarini, A., Fornasier, F., Toussaint, M.-L., Parelle, J., Chalot, M., 2022. Digestate improved birch (<i>Betula pendula</i>) growth and reduced leaf trace element contents at a red gypsum landfill. <i>Ecological Engineering</i> 185, 106815. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2022.106815 (IF 2022: 4.379)
Manuscrit 2 Publié.	Malabad, A.M. , Tatin-Froux, F., Gallinet, G., Colin, J.-M., Chalot, M., Parelle, J., 2022. A combined approach utilizing UAV 3D imaging methods, in-situ measurements, and laboratory experiments to assess water evaporation and trace element uptake by tree species growing in a red gypsum landfill. <i>Journal of Hazardous Materials</i> 127977. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127977 (IF 2021: 14.224)
Manuscrit 3 En préparation.	Malabad, A.M. , Pfendler, S., Armengaud, J., Valot, B., Chalot, M. (2023). Proteogenomics insights of a high manganese-solubilisation capacity <i>Pseudomonas sp</i> isolate from a red gypsum landfill. <i>En cours de preparation</i>

Liste des communications :

Communication	Références
SETAC Dublin, Irlande.	Malabad A.M. , Tatin-Froux F., Gallinet G., Chalot M., Parelle J., 2020 - Managing water evaporation and trace element accumulation using tree species at a red gypsum landfill. – SETAC SciCon, Europe 30th Annual Meeting. (<i>Oral presentation online</i>).
JDD Besançon, France.	Malabad A.M. , Parelle J., Tatin-Froux F., Chalot M., 2020 – « Managing water evaporation and trace element accumulation using tree species at a red gypsum landfill ». <i>Journée des doctorants du laboratoire Chrono-Environnement UMR 6249 CNRS/UBFC</i> . 17 janvier, Besançon – France. <i>Communication orale</i> .
FJC Dijon, France.	Malabad A.M. , Parelle J., Tatin-Froux F., Chalot M., 2019 – « Phytomanagement of a red gypsum landfill ». <i>Forum des Jeunes Chercheurs de l'Ecole doctorale Environnements Santé, UBFC, 25^e édition</i> . 13-14 juin, Dijon – France. <i>Poster</i> .
JDD Besançon, France.	Malabad A.M. , Parelle J., Tatin-Froux F., Chalot M., 2018 – « Revégétalisation d'un terri de sous-produits industriels ». <i>Journée des doctorants du laboratoire Chrono-environnement UMR 6249 CNRS/UBFC</i> . 17 décembre, Besançon – France. <i>Poster</i> .

Contexte de la thèse

Contexte de la thèse

Sous la direction du Professeur Michel CHALOT et du docteur Julien PARELLE, mon projet de thèse s'inscrit dans l'action phare « Contamination des écosystèmes : impacts, mécanismes et remèdes » et l'action innovante « Environnement minier : histoire, biodiversité et risques » du laboratoire Chrono-environnement (UMR 6249 CNRS / UFC), thème ECOS (Écosystèmes - Contaminants – Santé). Le co-encadrement est justifié par la dualité du sujet de thèse qui demande à la fois des compétences en écophysiologie végétale et en écologie microbienne. Ce projet de thèse à partir de plusieurs approches transdisciplinaires (l'écophysiologie végétale, l'agronomie, la télédétection, et la microbiologie), combine des essais *in-situ* et des expériences en mésocosme au laboratoire afin de répondre aux différents enjeux liés à la revégétalisation et à la biodynamisation de terrils industriels.

Les essais de terrain se sont déroulés sur le site d'Ochsenfeld où est situé un terril de gypse rouge, sous-produit de l'extraction du titane (Ti) enrichi en fer (Fe), manganèse (Mn), et zinc (Zn), entre autres. Les eaux pluviales percolant dans le gypse rouge du terril se chargent progressivement en éléments traces métalliques (ETM). C'est pourquoi le terril d'Ochsenfeld est isolé complètement de la nappe phréatique par des parois étanches moulées de 3,5 km de long. Dans le cadre du Projet PROLIPHYT (PROduction de Ligneux PHYToremédiant) (financé par l'agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (ADEME) dans le cadre du Programme d'Investissements d'Avenir « Eco-Industrie » 2013-2018), qui a pour but d'accroître le panel d'espèces ligneuses utilisables pour le phytomanagement et optimiser leur production, 50 espèces ligneuses ont été plantées dont 18 sur une parcelle expérimentale mise en place en 2014 sur le site d'Ochsenfeld. Les 18 espèces d'arbres plantées ont été sélectionnées en fonction de leur tolérance vis-à-vis des conditions pédogéochimiques et climatiques locales. Sur les 18 essences ligneuses, 16 ont eu une croissance significative. Mon projet de thèse fait suite au projet PROLIPHYT, et vise à étudier la relation entre croissance, flux d'eau lié à la transpiration, et translocation des ETM de ces espèces d'arbres sur le gypse rouge enrichi en ETM et défavorable au développement des arbres. En amont, la biodynamisation du substrat par des amendements organique (digestat) et biologique (inoculum bactérien) a été testée.

Ce manuscrit de thèse est organisé en 5 principales parties.

- La première partie correspond à la synthèse bibliographique et présente une revue de la littérature sur la contamination des sites et sols par des ETM, la translocation des ETM dans les plantes, les facteurs impactant cette translocation à l'exemple de la transpiration, l'impact des ETM, la revégétalisation des sites et sols pollués et la biodynamisation grâce aux amendements organique et biologique, ainsi que l'utilisation de la télédétection pour le suivi de la végétation.

- La deuxième partie comprend l'objectif général, les objectifs spécifiques de la thèse et les enjeux du site d'étude.

- La troisième partie décrit le site d'étude, les parcelles et les aspects expérimentaux avec la présentation de l'ensemble des mesures qui ont été réalisées.

- La quatrième partie présente les différents résultats acquis lors de cette thèse. Elle est subdivisée en 3 chapitres, chacun présentant un article publié ou en cours de préparation en anglais. Le chapitre 1 publié dans la revue « Ecological Engineering », évalue la capacité de digestat et de l'inoculum bactérien à améliorer la croissance des végétaux, et leur effet sur les ETM. Le chapitre 2 publié dans « Journal of Hazardous Materials » présente la capacité de transpiration des 16 espèces d'arbres d'un dispositif de phytomanagement implanté sur un site industriel et souligne l'apport essentiel dans ce domaine, des techniques innovantes comme la télédétection portée par les drones. Le chapitre 3 (en cours de préparation pour être soumis) étudie la solubilisation du Mn par une souche de *Pseudomonas sp*, isolée sur le site d'Ochsenfeld, et dont le génome complet a été séquencé.

- La cinquième et la dernière partie présente la discussion générale, les conclusions et les perspectives de ce travail de thèse. Elle vient relier et synthétiser l'ensemble des résultats obtenus, discuter l'apport des amendements digestat et bactérien sur la croissance des plantes, l'absorption et la translocation des ETM, la relation entre la transpiration et la translocation des certains ETM, et enfin le rôle des bactéries dans la solubilisation du Mn, l'un des principaux contaminants du site d'études.

Synthèse bibliographique

1 Synthèse bibliographique

Les activités anthropiques à partir de la révolution industrielle du XVIII^e siècle ont eu un impact marqué sur la nature, en causant la contamination d'un grand nombre des sites et sols dans le monde. Estimés à plus des 3 millions (Naidu, 2013), la gestion des sites contaminés est un enjeu environnemental et sociétal majeur. Les activités extractives en particulier, sont l'une des causes de la dégradation des sols. Selon le *Centre Commun de Recherche* qui est le service scientifique interne de la Commission européenne, l'étendue mondiale des terres touchées par ces industries extractives oscillent entre 300 000 et 800 000 km² (Joint Research Centre, 2017). En parallèle de ces augmentations importantes du nombre des sites contaminés, nous assistons à un très grand accroissement de la population mondiale. Selon les estimations et projections démographiques officielles des Nations Unies préparées par la division de la population du département des affaires économiques et sociales du Secrétariat des Nations Unies, la population mondiale devrait atteindre 8,5 milliards en 2030, 9,7 milliards en 2050 et 10,9 milliards en 2100 (DESA PD, 2019). Avec cet important accroissement de la population mondiale d'une part et l'augmentation des sites contaminés dont certains à l'état de friche d'autres part, la question d'une gestion adéquate des sites est plus que nécessaire, pour répondre au besoin d'espaces et à la pression foncière.

En Europe, aujourd'hui, l'*European Soil Data Center* estimait à plus de 2,5 millions le nombre de sites potentiellement contaminés dont environ 342 000 sont confirmés comme des sites contaminés. Les déchets municipaux et industriels contribuent le plus à la contamination des sols (38%), suivis par le secteur industriel/commercial (34%). Les ETM sont les principaux contaminants qui contribuent pour environ 35% à la contamination des sols européens (Panagos et al., 2013). Marquée par 200 ans d'industrialisation, la France en particulier compte au 10 juin 2020, 7329 sites et sols pollués (SSP) dont seulement 13,36% seraient traités et libres de toutes restrictions (Basol, 2020). La base des données BASOL sur les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif, était un site internet du ministère de la transition écologique français. Depuis novembre 2021, une nouvelle base de données a été mise en place pour recenser les anciennes activités susceptibles d'être à l'origine d'une pollution des sols ; il s'agit de CASIAS (carte des anciens sites industriels et activités de services). Les informations CASIAS sont alimentées en partie

par la base de données BASIAS (banque de données d'anciens sites industriels et activités de services) issue des inventaires historiques régionaux.

1.1 SSP en France

En 1998, le sens des termes contamination et pollution, souvent employés confusément l'un pour l'autre, est établi par le rapport N°42 de l'Académie des Sciences (Bourrelier et al., 1998). Le terme de « contamination » qualifie un apport d'éléments, issus de l'extérieur du site ; la conséquence en est une élévation de leur teneur originelle, sans indication sur leurs conséquences sur le comportement des organismes vivants présents sur ou à proximité du site. Le sol d'un site est donc considéré comme contaminé par un élément, lorsque la teneur de cet élément est significativement supérieure à sa concentration naturellement retrouvée dans le sol du secteur étudié, c'est-à-dire le fond pédo-géochimique naturel local (FPGN) (Citeau et al., 2008). Le FPGN est la concentration naturelle d'un élément dans un horizon de sol, résultant de l'évolution géologique et pédologique, à l'exclusion de tout apport anthropique (Baize, 1997). Le terme de « pollution » en revanche, doit être réservé à une contamination qui engendre une perturbation du milieu, ou de l'usage normal qui en est fait habituellement (altérations biologiques, physiques et chimiques).

Selon *l'Agence Européenne de l'Environnement*, sur la base des rapports des 38 pays européens, la France se place en 5^{ème} position derrière le Luxembourg, la République Tchèque, le Pays-Bas, et la Belgique, des pays ayant les plus fortes densités des sites potentiellement contaminés par habitant (Figure 1). C'est en raison de leur passé industriel mais aussi, parce qu'ils incluent les activités potentiellement polluantes dans leurs chiffres, contrairement à d'autres pays, comme l'Autriche, la Hongrie et la Norvège, qui n'incluent dans leurs chiffres que les sites pour lesquels il existe des preuves d'une contamination potentielle. Les ETM représentent la première source de pollution et les principaux contaminants inorganiques des sols européens, en contribuant à environ 34.8 % de la contamination du sol (Figure 2).

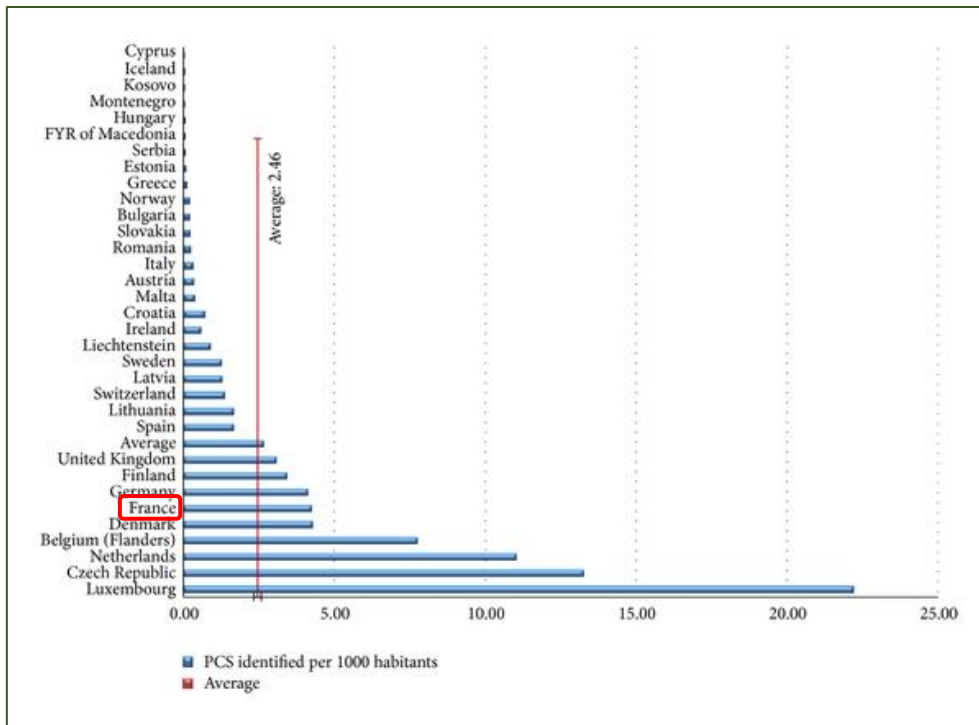


Figure 1 : Densité des sites potentiellement contaminés par 1 000 habitants dans 33 pays européens (Panagos et al., 2013).

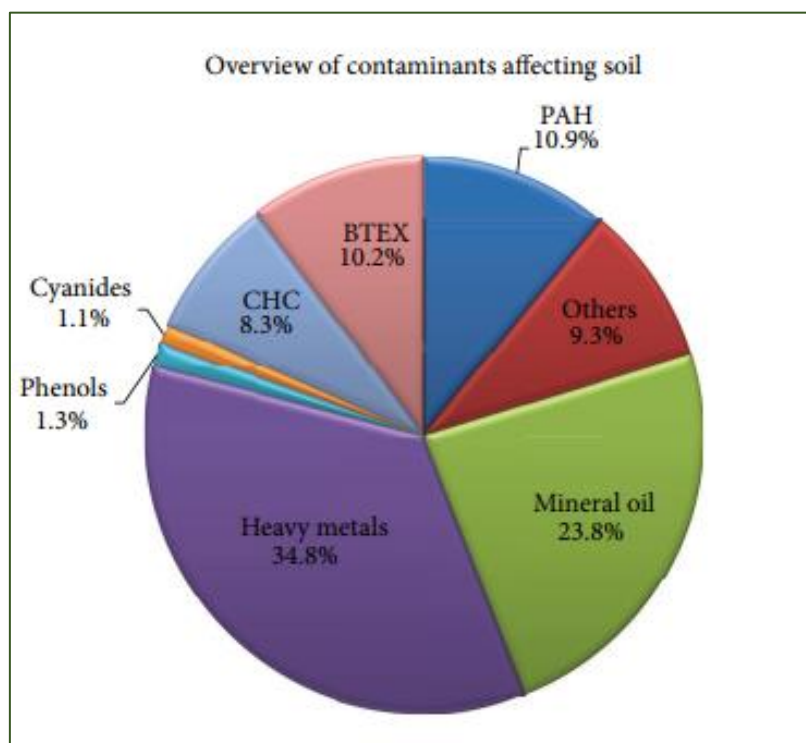


Figure 2 : Distribution des contaminants affectant le sol européen (Panagos et al., 2013).

L'ensemble du territoire français est concerné par la présence des SSP (Figure 3). Cependant, il existe une grande hétérogénéité entre les différentes régions. Les anciennes régions minières sont celles qui concentrent le plus de friches industrielles (Figure 4) avec la région Auvergne-Rhône-Alpes qui vient en premier lieu (18,1 %), suivie de la région Grand Est (15,1 %), région de notre site d'études, et puis celle des Hauts-de-France (13,6 %). À l'opposé, les trois régions métropolitaines plutôt agricoles (Bretagne, Pays de la Loire, Provence-Alpes-Côte d'Azur), ainsi que l'ensemble des régions d'outre-mer et la Corse, totalisent un peu moins de 10 % de l'ensemble des SSP. Près d'un quart des sites contaminés en France sont pollués par des ETM (Figure 5), ce qui fait des ETM, la famille des contaminants la plus impactante derrière les hydrocarbures.

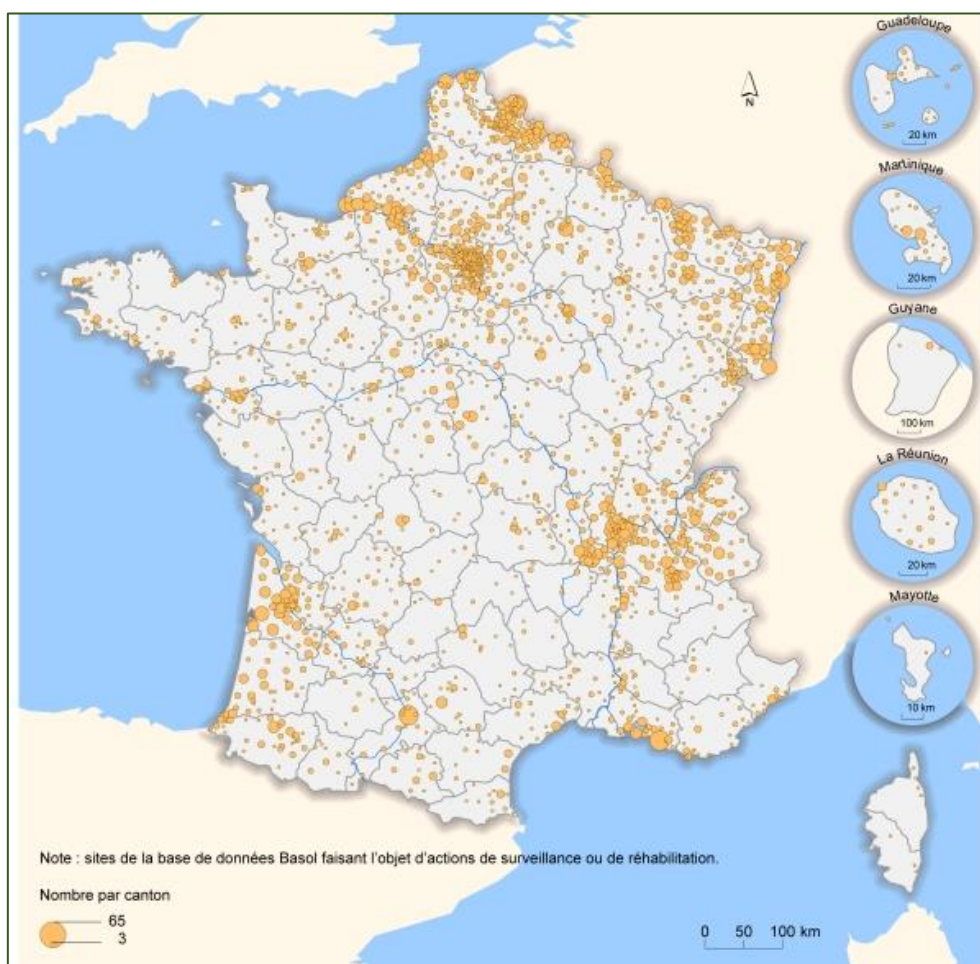


Figure 3 : les sites et sols pollués en France (MTES, 2015)

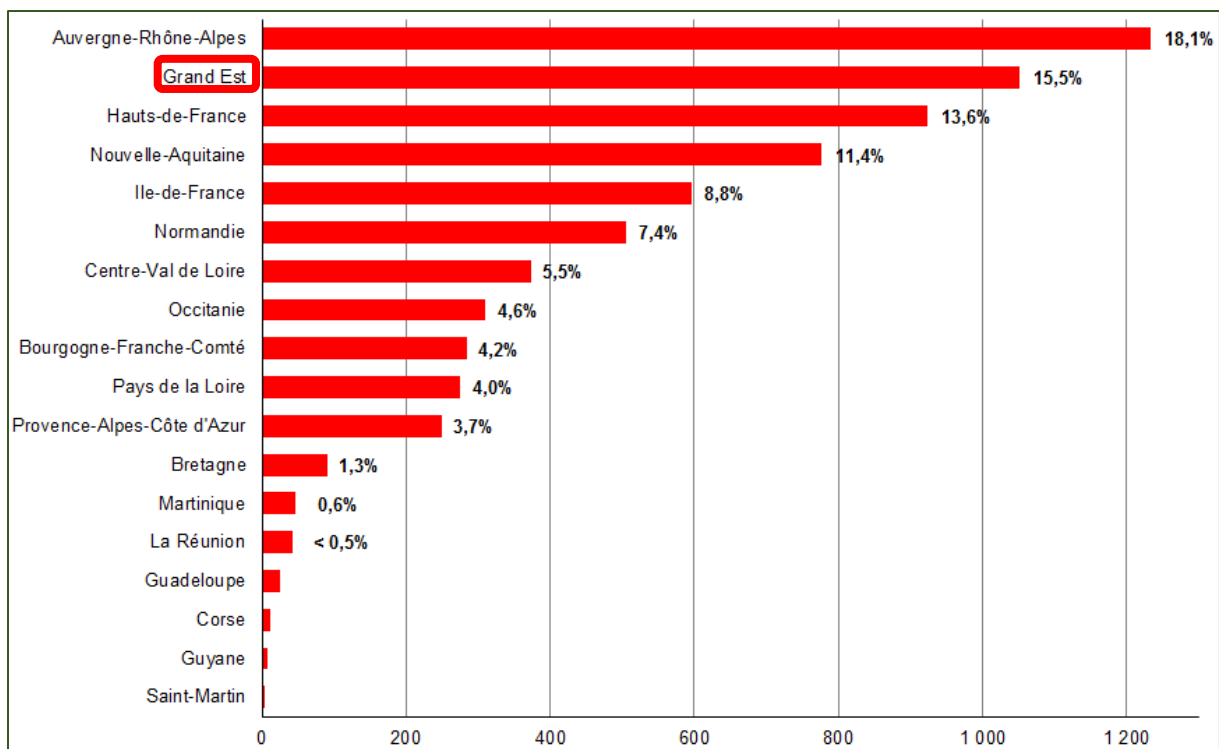


Figure 4 : Nombre de sites et sols pollués par région en France (MTES/DGPR, BASOL au 4 juillet 2018)

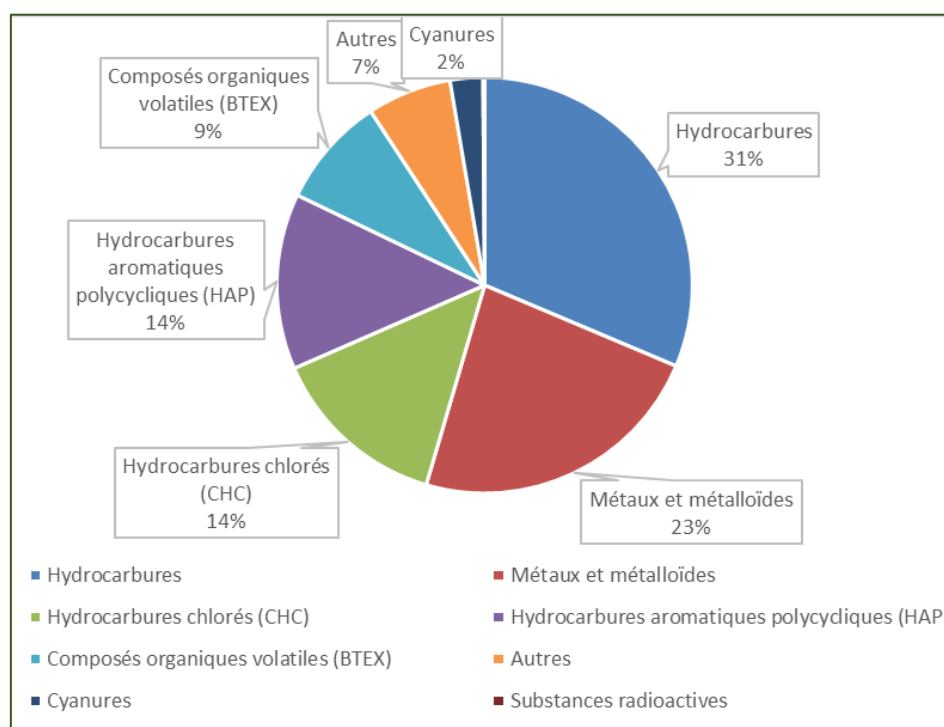


Figure 5 : Poids global des 7 familles de polluants identifiés dans les sols français (MTES/DGPR, BASOL au 4 juillet 2018)

En France, les SSP ne sont pas soumis à un cadre juridique spécifique, mais s'appuient principalement sur la législation relative aux installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), notamment le Livre V du code de l'environnement intitulé « *Prévention des pollutions, des risques et des nuisances* ». Les mesures de remise en état ou de restauration d'un site pollué sont à la charge du responsable de la pollution. Le principe pollueur-payeur selon lequel « *les frais résultants des mesures de prévention, de réduction de la pollution et de lutte contre celle-ci sont supportés par le pollueur* » s'applique. Dans le cas des ICPE, le responsable est le dernier exploitant de l'installation à la source de la pollution, et pour les autres activités (hors ICPE), le responsable est le producteur de déchets à l'origine de la pollution. Concernant les pollutions actuelles et futures, les SSP sont gérées selon le *principe de prévention et de réparation*. Cependant, pour les SSP historiques, la politique de gestion appliquée en France est une politique de *gestion des risques en fonction de l'usage futur* des milieux. La méthodologie nationale de gestion des SSP actualisée en 2017 par l'ADEME repose sur des outils de gestion tels que l'analyse de l'état des milieux, l'interprétation de l'état des milieux, le plan de gestion et l'ingénierie de dépollution.

Concernant les activités minières, la France pose les premières lois dès 1791. Ces lois ont évolué notamment en matière de sécurité des personnels, de prise en compte de l'environnement, de gestion des sous-produits, ou encore d'abandon des installations. La Directive européenne 2006/21/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2006 concernant la gestion des déchets de l'industrie extractive (Directive DDIE) stipule plusieurs points parmi lesquels nous pouvons citer, par exemple, l'obligation de diminuer la production de lixiviats pour limiter la contamination des eaux de surface ou des eaux souterraines, et l'obligation d'élaborer d'un plan de gestion des sous-produits pour une meilleure réduction, traitement, et valorisation, en tenant compte du principe de développement durable. Pour les activités extractives de TiO₂, la France ainsi que les autres pays de l'Union Européenne, a adopté la directive du Conseil n° 92/112/CEE, du 15 décembre 1992, fixant *les modalités d'harmonisation des programmes de réduction, en vue de sa suppression, de la pollution provoquée par les déchets de l'industrie du dioxyde de titane*. Dans cette directive, il est demandé que les résidus solides doivent être classés en fonction du type de gestion, en tenant compte de leur nature. Les résidus sont à éviter ou à réutiliser chaque fois que cela est techniquement et économiquement possible. Ils sont à réutiliser ou éliminer sans risque pour la santé humaine ni atteinte à l'environnement. La gestion des sites de dépôts est un enjeu d'autant

plus important que les impacts des contaminations sur l'environnement et *in fine* sur la santé humaine sont aujourd'hui au centre des préoccupations sociétales.

1.2 Mobilité et transfert des ETM

1.2.1 Transfert d'ETM dans le continuum sol-eau-atmosphère

La croûte terrestre est composée de 80 éléments chimiques dont 12 éléments majeurs et 68 éléments traces. Les éléments majeurs (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti, H, P et Mn) à eux seuls représentent 99,4 %. Les éléments traces qui ne représentent que 0,6%, ont pour chacun une concentration inférieure à 1 pour mille. Dans cette thèse, le terme ETM est utilisé pour désigner ces 80 éléments (traces ou majeures, et métalliques ou métalloïdes) constituant la croûte terrestre. Certains ETM sont indispensables aux processus biologiques donc à la production végétale : ce sont les oligo-éléments tels que le Zn, Mn, Cu, etc. Par exemple, le Mn est un micronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes, car il intervient dans plusieurs processus métaboliques, principalement dans la photosynthèse et comme cofacteur antioxydant des enzymes. D'autres ETM ne jouent aucun rôle avéré, à l'exemple du Cd, Pb et Hg. Les ETM sont les polluants les plus communs et les plus répandus dans les sols. Ils peuvent provenir de sources naturelles, telles que l'érosion des roches ou le volcanisme, mais sont majoritairement issus d'apports anthropiques dues aux activités industrielles actuelles ou anciennes, urbaines, minières, agricoles ou domestiques.

Dans le contexte des activités minières, il y a une possibilité de transfert et de mobilité d'ETM entre différents compartiments : air, eau et sol (Figure 6). L'atmosphère peut être polluée directement par des particules émises par la fonderie ou par l'érosion éolienne en remettant en suspension tous types de matériaux polluants issus des minerais stockés à ciel ouvert ou des terrils des sous-produits. Le transfert de particules contenant des ETM de l'atmosphère vers les sols ou l'eau peut se faire par dépôt humide ou sec. Le sol peut être également directement contaminé par les stockages des minerais ou des sous-produits, ou encore par percolation d'eaux contaminées surtout à proximité des terrils. L'aquifère peut être atteint par les infiltrations d'eaux contaminées issues des usines.

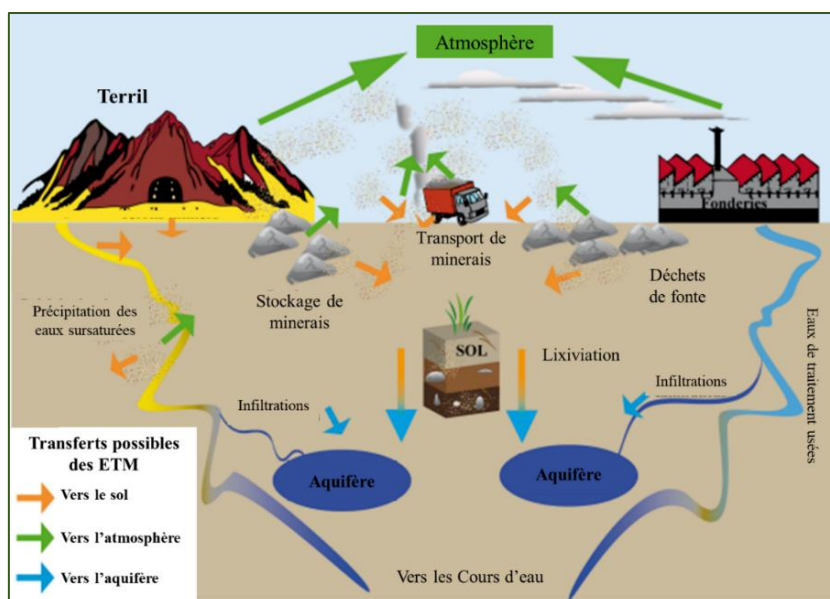


Figure 6 : Schéma récapitulant les transferts possibles d'ETM entre les différents compartiments dans le cadre d'une activité minière (adaptée de Goix, 2012).

1.2.2 Biodisponibilité des ETM

Dans le cadre du programme ASPITET (Apports d'une Stratification Pédologique à l'Interprétation des Teneurs en Eléments Traces) lancé de 1993 à 2005, des chercheurs de l'INRAE ont établi les teneurs totales en ETM dans des sols français (Tableau 1). La teneur totale d'un ETM permet d'appréhender le stock de cet élément à un moment donné, mais elle ne renseigne nullement sur sa mobilité dans le sol ou de sa disponibilité pour des végétaux. Pour étudier le transfert des ETM du sol vers les végétaux, l'étude de la biodisponibilité des ETM pour les plantes, ainsi que l'étude des paramètres physico-chimiques du sol sont essentielles.

Tableau 1 : Teneurs totales en ETM dans des sols français (Baize, 2000)

	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Mn	Fe
Nb valeurs	768	695	791	787	797	790	804	735	767
Minimum	<0,02	<1	<2	<2	<2	2,2	<5	<10	0,05
1 ^{er} décile	0,03	3,1	27,5	5	8,7	17,2	31	149	1,27
1 ^{er} quartile	0,07	7,6	45,1	8,2	18	23,1	49	408	2,16
Médiane	0,16	14,0	66,3	12,8	31	34,1	80	754	3,24
Moyenne	0,42	17,1	75	14,9	41,3	64,8	149	7585	3,65
3 ^e quartile	0,47	21,3	90,7	18,1	48,6	48,5	132	1473	4,57
9 ^e décile	1,06	32,4	118	27,2	78,9	91,5	275	3332	6,47
Maximum	6,99	148	691	107	478	3088	3820	24975	19,16
Seuils ^a	2	30 ^b	150	100	50	100	300	-	-

a = seuils de l'arrêté du 8 janvier 1998 sur l'épandage des boues d'épuration.

b = ce seuil, proposé par Godin en 1984 pour le Co, n'a pas été retenu dans la norme française

Dans la littérature, plusieurs définitions ont été données au concept de la biodisponibilité. Cependant une seule a été adoptée par la Norme ISO/TS 11074 (2005) et la Norme EN ISO 17402 (2011), qui définit la biodisponibilité comme étant « *le degré auquel 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 les systèmes biologiques* ». Dans cette thèse, la fraction biodisponible d'ETM correspond à la quantité d'un élément pouvant être absorbée par les plantes. La fraction biodisponible est donc un outil permettant d'évaluer les risques de transfert des contaminants vers les végétaux. Des exemples des différents types d'extractions utilisés pour estimer la fraction biodisponible sont donnés dans le Tableau 2. Les principaux types de solutions d'extraction peuvent être de l'eau déionisée, des solutions salines, des acides dilués ou des complexant organiques. Les extractants chimiques peuvent varier depuis des acides très forts tels que l'acide nitrique ou l'acide chlorhydrique, à des solutions salines comme le chlorure de calcium (CaCl_2) qui est l'un des extractants le plus utilisé (Feix and Tremel-Schaub, 2005), et qui à faible concentration permet d'avoir une meilleure estimation de la concentration de l'ETM dans la solution du sol. Les ions Ca sont fortement absorbés par le complexe argilo-humique qui déplacent aisément les ions fixés sur ce complexe par une réaction d'échange (Ettler et al., 2007; Meers et al., 2007a). En effet, l'ion sous forme libre (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , ... etc.) est l'une des formes les plus réactives et plus facilement assimilable par les organismes vivants.

Tableau 2 : Solutions d'extraction utilisées pour estimer la biodisponibilité des ETM dans le sol (adopté d'après Harmsen, 2007)

Type d'extraction	Simule	Exemple
Eau	La concentration de l'eau interstitielle du sol	Micro-préleveur de solution du sol Centrifugation
Sel neutre	La concentration de l'eau interstitielle du sol	0.01 M CaCl_2 1 M NH_4NO_3 0.1 M NaNO_3
Acide	Potentiellement soluble dans l'eau	Acide fort dilué : 0.43 M HNO_3 Acide faible : 0.43 M CH_3COOH
Agent complexant	Potentiellement soluble dans l'eau	EDTA DTPA

Les paramètres physico-chimiques du sol tels que le pH, la matière organique, le potentiel redox, ou la granulométrie peuvent renseigner sur le potentiel de rétention des ETM. Le pH du sol est le paramètre clé qui influence la mobilité des ETM. De petites variations du pH peuvent entraîner des modifications importantes de la concentration des ETM. La plupart des ETM est plus mobile en condition acide qu'en milieu alcalin : la baisse du pH favorise la

mobilité des ETM, notamment en dissolvant les sels métalliques, alors qu'à l'inverse l'augmentation du pH cause l'immobilisation des ETM en formant des composés insolubles. La matière organique joue un rôle important dans la partition des ETM en les fixant formant un complexe ETM-matière organique. Ainsi, un sol riche en C organique produira une grande quantité de CO₂, formant des composés organométalliques stables dans le sol. La décomposition de la matière organique en modifiant les conditions redox pourrait aussi induire la dissolution des oxyhydroxydes de Mn et Fe etc, (Thanh-Nho et al., 2019). Le potentiel redox peut impacter directement la mobilité des ETM en intervenant soit dans le changement du degré d'oxydation des ETM, ou des éléments se liant avec les ETM pour former un complexe soluble, soit dans la formation ou la dissolution de phases porteuses des ETM. Par exemple, le chrome est beaucoup moins toxique sous sa forme Cr(III) que sous forme Cr(IV) (Bandara et al., 2020). Le potentiel redox peut aussi avoir de l'influence sur les composants du sol fixant les ETM, tels que les oxydes de Mn et de Fe qui sont très peu solubles et donc immobilisent les ETM qui leur sont associés, en absence d'oxygène (Eh=0mV). Cependant, en condition d'aérobiose, ces composés sont réduits et solubilisés, entraînant une libération des ETM associés (Pezeshki and DeLaune, 2012). La granulométrie (la taille des particules de sols et leur organisation) peut aussi avoir un effet sur la mobilité de certains ETM en impactant l'aération des sols par exemple. Un sol de texture fine par exemple est plus susceptible de retenir les ETM. (Parra et al., 2014) ont déterminé que les concentrations des ETM (As, Ca, Cu, Pb et Zn) sont 3 à 4 fois plus élevées dans les fractions de sol les plus fines (0,3-0,7 µm) que dans les fractions > 20 µm.

La mobilité et la biodisponibilité des ETM ne dépend pas que des propriétés physico-chimiques des sols, mais aussi de l'influence des microorganismes et des processus rhizosphériques qui régulent le prélèvement des ETM par les végétaux. L'influence des microorganismes dans la mobilité des ETM est détaillée dans la section 1.3.2.2 Les amendements biologiques. Il est important de noter que certains végétaux tolèrent mieux que d'autres certains types des ETM.

1.2.3 Transfert d'ETM dans le système sol-plantes

Les végétaux absorbent les ETM sous forme d'ions libres, de complexes solubles inorganiques et de complexes organométalliques associés à des ligands (Antoniadis et al., 2017). L'entrée des ETM chez les végétaux peut se faire par les parties aériennes (via des particules en suspension dans l'air, des composés gazeux tels le Hg ou des composés dissous dans l'eau de pluie ou d'irrigation) ou par les racines via la pollution du sol. Les plantes

absorbent préférentiellement les ETM de la solution du sol, sous forme ionique libre ou complexée. Une fois prélevés, les ETM peuvent être piégés et ne pas circuler dans la plante ou alors être transportés du lieu de l'absorption vers un autre organe végétal (Feix and Tremel-Schaub, 2005). Le transfert du Hg est réalisé par voie aérienne (absorption foliaire du Hg atmosphérique) notamment pour la famille des *Salicaceae* (peuplier) et des *Solanaceae* (poivron, tabac) (Assad et al., 2017). Les ETM tel que le Cd, le Pb et le Zn s'accumulent sur des plantes en passant par voie rhizosphérique (Qasim et al., 2016). Le Mn par exemple se déplace librement dans la sève du xylème des plantes et est transporté vers les feuilles par le flux de transpiration (Ducic and Polle, 2005).

En contact aux ETM de sol, les végétaux ont développé des stratégies d'adaptation à la contamination qui se traduisent par 4 modalités (Figure 7). La stratégie adoptée par la plupart des végétaux est ***d'exclure ou de minimiser l'absorption des ETM***, en changeant le mouvement des ions à l'intérieur de l'organisme par exemple par la modification de leur rhizosphère pour contribuer à une diminution de la biodisponibilité des ETM (Dalvi and Bhalerao, 2013). Ces végétaux sont aussi capables de sécréter dans le sol des acides organiques comme le citrate ou le malate, ainsi que des acides aminés comme l'histidine pour chélater les ions métalliques et les transformer en formes insolubles (Muszyńska and Labudda, 2019). Les parois cellulaires de ces végétaux composées de cellulose, d'hémicellulose, ou de pectine fournissent de nombreux groupes hydroxyle ou carboxyle qui lient les ions et diminuent ainsi leur migration dans le protoplaste, ce qui peut immobiliser jusqu'à 90% de Pb, Cd, Cu ou Zn. Par exemple, des complexes de Pb ou de Cd avec les composants de la paroi cellulaire des racines ont été observés dans *Arabidopsis thaliana* (Van Belleghem et al., 2007). Ce sont des plantes qui peuvent être utiliser comme phytostabilisatrices en contexte de phytomanagement.

La seconde stratégie adoptée par les végétaux est ***l'accumulation des ETM dans leurs tissus aériens***. Nous pouvons distinguer des indicateurs, des accumulateurs et des hyperaccumulateurs. Pour les végétaux indicateurs, les concentrations des ETM dans leur partie aérienne reflètent les concentrations des ETM dans le sol. Ces espèces végétales sont celles proposées pour la surveillance de la pollution environnementale (Phillips et al., 2015). Les accumulateurs et les hyperaccumulateurs sont des végétaux capable de transférer efficacement des ETM vers la partie aérienne via le xylème (Lu et al., 2013). Les hyperaccumulateurs peuvent accumuler dans leurs parties aériennes sans symptômes de toxicité des teneurs en ETM comme le Cd, le Zn, le Co, le Mn, le Ni ou le Pb jusqu'à 100 à 1 000 fois plus élevées que des

espèces non hyperaccumulatrices (Suman et al., 2018; Tangahu et al., 2011). Les caractéristiques d'hyperaccumulation de Zn et Cd par exemple, ont été confirmées chez *Noccaea caerulescens* (Dessureault-Rompré et al., 2010) ainsi que chez *Arabidopsis halleri* (Huguet et al., 2012). Concernant l'hyperaccumulation du Mn, elle est reconnue à la concentration seuil théorique de 10 000 mg/kg MS (van der Ent et al., 2013). Elle est rapportée principalement pour les genres *Alyxia*, *Denhamia*, *Gossia*, *Grevillea*, *Macadamia* et *Virotia*, qui sont distribués principalement dans l'est de l'Australie et en Nouvelle-Calédonie (Abubakari et al., 2022). Les ETM sont chargés dans le xylème et sont transportés sur de longues distances avec différents ligands, principalement avec des acides aminés libres, comme l'histidine et la nicotianamine, qui forment des complexes stables avec des cations bivalents (Álvarez-Fernández et al., 2014). Il a également été démontré que les acides organiques peuvent être responsables du chargement et du déchargement des ions dans et hors du xylème et du phloème, comme cela a été observé chez *Sedum alfredii*, où la concentration de citrate dans la sève du xylème augmentait avec la teneur en Zn du milieu de culture (Lu et al., 2013).

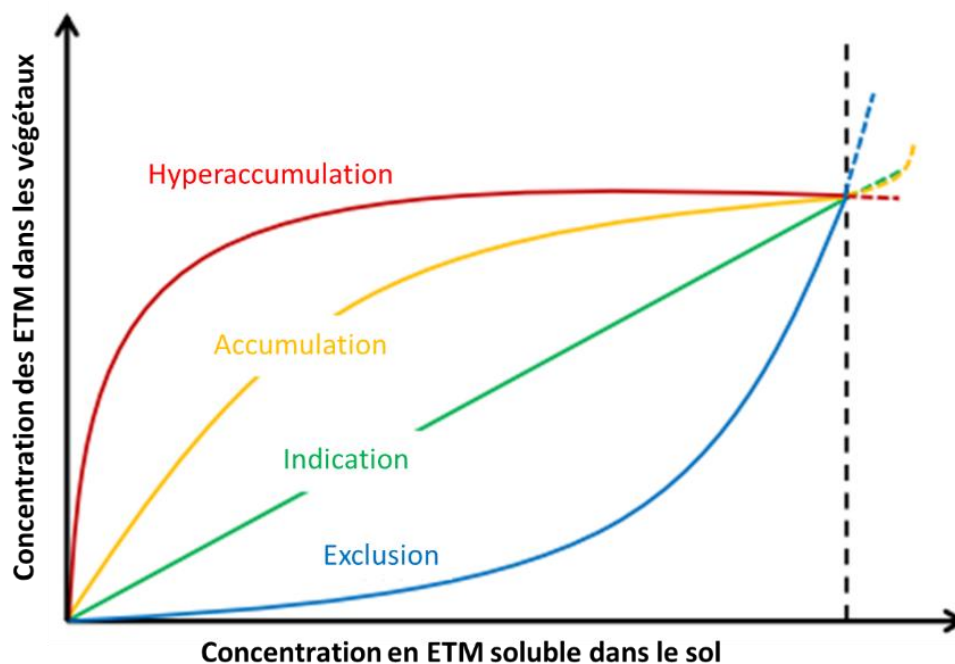


Figure 7 : Différentes réponses des végétaux à l'accroissement de la quantité des ETM dans le sol (adaptée de Robinson et al., 2009).

1.2.4 Transpiration et translocation des ETM

La translocation est le transfert des ETM au sein de la plante. Elle peut varier considérablement en fonction de l'ETM, mais également de l'espèce végétale. Chez les végétaux vasculaires, la translocation est effectuée par un appareil conducteur composé de deux types de tissus : le xylème et le phloème. Elle peut donc être associée à la circulation de l'eau des racines vers les feuilles. L'eau, qui s'évapore des feuilles, sert de pompe pour absorber les nutriments et autres substances du sol pour les végétaux. Ce flux de transpiration via le xylème, ainsi que le transfert du xylème au phloème et la translocation via le phloème sont des processus importants pour la redistribution des ETM dans la plante (Marschner, 2011).

1.2.4.1 Généralités

La transpiration foliaire (E exprimée en $\text{mol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$) est le flux de vapeur d'eau sortant d'une feuille à travers ses stomates. Elle est obtenue par le produit de la conductance stomatique pour la vapeur d'eau (g_s exprimée en $\text{mol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$) et de la différence de fraction molaire de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires de la feuille et l'atmosphère ($w_i - w_a$, exprimée en $\text{mol H}_2\text{O}/\text{mol air}$). g_s exprime l'aptitude de l'ouverture stomatique à contrôler les échanges gazeux depuis ou vers la feuille (Tuzet, 2011).

$$E = g_s \times (w_i - w_a)$$

Les stomates sont également la principale entrée pour l'absorption du CO_2 et relie ainsi la transpiration à la photosynthèse (Jones, 1998). En faisant varier la transpiration en réponse à la demande évaporative, les stomates influencent directement l'absorption de CO_2 pour la photosynthèse et ainsi la croissance des plantes (Damour et al., 2010). L'indice de surface foliaire (LAI pour leaf area index) qui représente l'état de croissance des plantes peut être utilisé pour remonter de la transpiration et de la conductance stomatique des feuilles à la transpiration de la canopée (E_c) et conductance de la canopée (g_c exprimée en $\text{mol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$) (Xu et al., 2021).

$$E_c = E \times \text{LAI}$$

$$g_c = g_s \times \text{LAI}$$

La circulation de l'eau dans la plante comprend une étape d'absorption racinaire, puis une circulation radiale et enfin une circulation axiale dans le xylème (Figure 8). L'absorption de l'eau se fait à travers des cellules épidermiques des racines. La circulation radiale de l'eau se fait par la traversée du cortex via deux voies distinctes à savoir le trajet apoplastique (l'espace entre les parois cellulaires interconnectées) ou symplasmique (la surface interne du cytoplasme de toutes les cellules vivantes, reliées par des plasmodesmes, et délimitées par la membrane plasmique de chaque cellule). La circulation axiale de l'eau se fait dans le xylème. L'eau puisée du sol par les racines à travers le système vasculaire de la plante s'évapore par les feuilles à travers les stomates vers l'atmosphère en suivant un gradient de potentiel hydrique. Cette évaporation d'eau crée une pression négative (tension) équivalente à environ -2 MPa à la surface de la feuille. L'eau des racines est tirée vers le haut par cette tension. La nuit, lorsque les stomates se ferment et que la transpiration s'arrête, l'eau est retenue dans la tige et la feuille par la cohésion des molécules d'eau entre elles ainsi que par l'adhésion de l'eau aux parois cellulaires des vaisseaux du xylème et des trachéides. Cette hypothèse de « la théorie de la cohésion-tension » est énoncée par (Dixon and Joly, 1895).

La transpiration des végétaux peut entraîner un déséquilibre de l'état hydrique au sein de la plante, caractérisé par le potentiel hydrique (Ψ exprimée en MPa). La notion de potentiel hydrique correspond à l'énergie libre de l'eau rapportée au volume molaire de l'eau. L'eau se déplace du potentiel le plus élevé au potentiel le plus bas (du moins négatif au plus négatif), donc de la zone qui retient le moins d'eau (la plus hydratée) à la zone qui retient le plus d'eau. Le potentiel hydrique d'une plante est la résultante des potentiels de turgescence (Ψ_p), osmotique (Ψ_o), et capillaire (Ψ_m). Ψ_p représente la pression positive exercée par la paroi cellulaire sur le contenu vacuolaire. Ψ_o toujours négatif ou nul pour l'eau pure est directement lié au contenu vacuolaire en solutés. Ψ_m dépendant des interactions entre les molécules d'eau au niveau des parois cellulaires.

$$\Psi = \Psi_p + \Psi_o + \Psi_m$$

Le potentiel hydrique de base (Ψ_{base}) est mesuré avant le lever du soleil, lorsque le végétal est considéré en équilibre avec le sol, il est donc étroitement lié à l'état hydrique du sol. Le potentiel hydrique foliaire (Ψ_{feuille}) définit l'état hydrique de la plante le jour, mesuré lorsque la plante transpire, à midi il atteint son minimum et correspond alors au potentiel hydrique minimum (Ψ_{min}). Le potentiel hydrique de xylème ($\Psi_{\text{xylème}}$) se mesure sur des feuilles ensachées

à l'aide d'un plastique ou sur des rameaux, qui ne transpirent pas. L'analogie électrique à la loi d'Ohm développée par (Honert, 1948), nous permet de modéliser la transpiration (E) comme étant le produit de la conductance hydraulique g_h , (résultante de toutes les conductances dans le continuum sol-plante-atmosphère (Figure 8), et de la différence de potentiel hydrique entre le sol et la feuille.

$$E = g_h \times (\Psi_{\text{base}} - \Psi_{\text{feuille}})$$

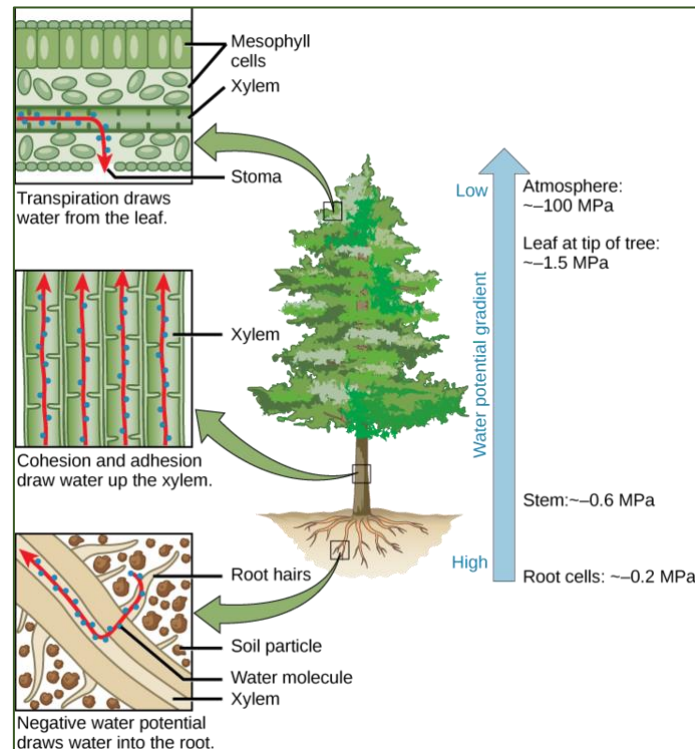


Figure 8 : Voies de circulation de l'eau dans la plante et illustration de la théorie de tension-cohésion (Biology OpenStax, 2018).

1.2.4.2 Lien entre le flux d'eau et le transfert des ETM

L'importance de la transpiration dans l'absorption et la translocation des nutriments est étayée par une multitude d'études (Houshmandfar et al., 2018; Masle et al., 1992; Sellin et al., 2013). Le taux de transpiration peut affecter l'absorption des nutriments à la fois directement, par des effets sur le taux de transport radial des nutriments tels que N, K, S, Ca, Mg et Mn, à travers l'apoplasme (Marschner, 2011), et/ou indirectement, en influençant l'approvisionnement en nutriments de la membrane plasmique des cellules racinaires (Cramer et al., 2009; Tinker and Nye, 2000). La diminution des taux de transpiration peut réduire l'épuisement des nutriments de la rhizosphère résultant de l'absorption par les plantes (Scholz et al., 2007). Dans une expérience de terrain menée avec le blé *Triticum aestivum* L. sur le site Agface en Australie,

la transpiration était positivement corrélée à l'absorption de N, K, S, Ca, Mg et Mn, avec un coefficient de corrélation de 0,96 pour N, 0,90 pour K, 0,96 pour S, 0,89 pour Ca, 0,95 pour Mg, et 0,89 pour Mn (Houshmandfar et al., 2018). *Populus sp* améliorait l'évapotranspiration et réduisait le lessivage de B par une forte accumulation dans la biomasse aérienne dans une étude conduite sur un site de stockage des déchets de bois à Kopu en Nouvelle-Zélande (Robinson et al., 2007). Dans une étude de terrain menée sur une plantation forestière expérimentale situé au village de Roka en Estonie orientale, une humidité relative artificiellement élevée a entraîné une diminution du flux transpiratoire de *Betula pendula* et l'apport de nutriments P et N au feuillage des bouleaux (Sellin et al., 2013).

La translocation des ETM peut se faire par la vascularisation : le xylème et le phloème qui sont deux systèmes de transport à longue distance aux propriétés différentes (Figure 9). Le xylème et le phloème fonctionnels sont souvent séparés par un cambium, bien que leurs éléments fonctionnels soient proches les uns des autres et peuvent interagir plus directement. Cette disposition permet le transfert sélectif des ETM du xylème vers le phloème (Page and Feller, 2015). Plusieurs études ont montré que certains ETM à l'exemple de Zn et Ni sont transférés du xylème au phloème, tandis que d'autres ETM comme le Mn ou Fe ne sont peu ou pas chargés dans le phloème (Page et al., 2006; Page and Feller, 2015, 2005; Riesen and Feller, 2005).

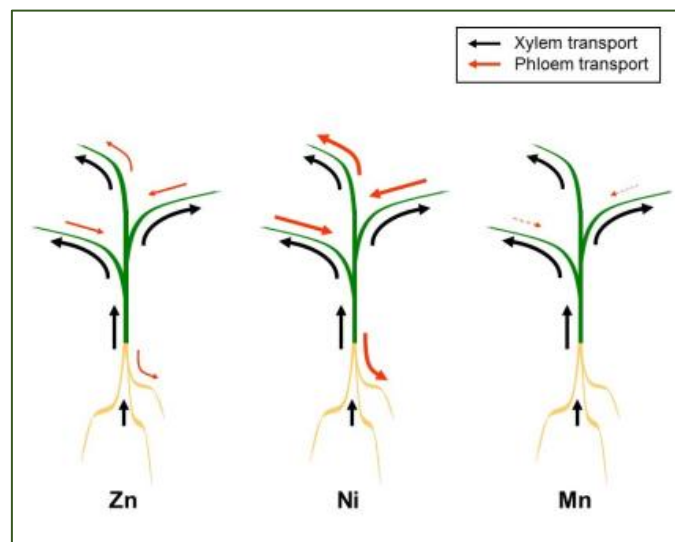


Figure 9 : Transport par le xylème et le phloème dans la plante intacte (Page and Feller, 2015).

Zn, Ni et Mn sont facilement transportés par le xylème vers la partie aérienne. Le Mn est essentiellement immobile dans le phloème, tandis que le Ni est rapidement redistribué vers les parties les plus jeunes de la plante et le Zn est plus lentement redistribué via le phloème.

Les ETM sont transportés vers le haut depuis les racines vers les feuilles avec le flux de transpiration dans le xylème. S'il n'y avait pas de retranslocation, les ETM s'accumuleraient principalement dans les feuilles photosynthétiquement actives. Une telle accumulation sans redistribution ou avec une redistribution mineure a été observée pour le Mn, le Ca, et dans une moindre mesure pour le Fe (Page et al., 2012). Dans les expériences réalisées par (Page et al., 2006) sur des plantules de blé (*Triticum aestivum L.*) et de lupin blanc (*Lupinus albus L.*) radiomarquées pendant 24 heures avec ^{65}Zn , ^{109}Cd , ^{54}Mn et ^{57}Co via une racine séminale pour le blé ou via la racine principale pour le lupin, sur des rhizoboxes contenant du sol, il a été observé une forte rétention dans la partie marquée de la racine pour le ^{57}Co dans le blé et le lupin et pour le ^{109}Cd dans le lupin, tandis que le ^{65}Zn et le ^{54}Mn ont été transportés vers la partie aérienne dans les deux plantes. Le ^{54}Mn s'est accumulé dans les premières feuilles et aucune redistribution majeure au sein des feuilles n'a été observée. Alors que le ^{65}Zn a été redistribué via le phloème des feuilles les plus anciennes aux plus jeunes. Contrairement au transport de la sève brute dans le xylème, qui utilise des tissus non vivants pour la voie conductrice, le transport sur de longues distances dans le phloème a lieu dans les cellules vivantes et permet une redistribution des ETM et des assimilés au sein de la plante. Le phloème est constitué de cellules criblées, de cellules compagnes étroitement associées et du parenchyme (Kochian, 1991). La mobilité dans le phloème des ETM varie d'un élément à un autre (Figure 9). Le Ni est très mobile dans le phloème et peut être redistribué à plusieurs reprises dans les plantes cultivées tout au long de la croissance végétative et de la phase de reproduction. Le Zn est également mobile dans les plantes et peut être transporté via le phloème vers les parties de la plante en croissance. Le Cd est moins mobile dans le phloème que le Zn, mais il est également redistribué dans une certaine mesure par le phloème pour s'accumuler dans les méristèmes. Le Mn et le Fe sont caractérisés par une faible mobilité dans le phloème et sont retenus dans les feuilles âgées (Page and Feller, 2015, 2005).

1.2.5 Effets des ETM sur les végétaux

Les ETM sont les polluants les plus communs et les plus répandus, et en raison de leur toxicité, la pollution métallique représente un risque pour les végétaux. Bien que certains ETM soit nécessaire au développement des plantes, à une concentration élevée, ils peuvent perturber certaines fonctions biologiques. La toxicité d'un ETM dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques et biologiques. Elle dépend notamment de la nature de l'élément essentiel ou non essentiel, de la forme chimique de l'élément, de sa concentration totale et biodisponible dans le

milieu, des propriétés physico-chimiques du sol (pH, potentiel redox, teneurs en argiles, teneurs et composition de la matière organique), de l'espèce impliquée et des microorganismes associés (Antoniadis et al., 2017). Les notions de dose et de temps d'exposition sont fondamentales pour l'étude d'impact des ETM. L'exposition aiguë des végétaux à des doses élevées d'ETM ou bien l'accumulation dans les tissus à la suite d'une exposition chronique, entraînera des effets de toxicité.

Les ETM exercent leur action toxique sur les végétaux (Figure 10), principalement en endommageant le chloroplaste et en perturbant ou en inhibant la photosynthèse (Sharma et al., 2020). L'inhibition de la photosynthèse est la conséquence de l'interférence des ions métalliques avec les enzymes photosynthétiques et les membranes des chloroplastes, induisant ainsi une limitation biochimique de la transpiration par fermeture des stomates, comme l'ont expérimenté (Aggarwal et al., 2011). De nombreuses études ont montré qu'un apport excessif des ETM entraîne des changements significatifs dans les relations hydriques des espèces d'arbres (Pandey and Sharma, 2003; Vernay et al., 2007). Il a également été observé dans des expériences menées en serre avec des hybrides de *Populus* que le taux de transpiration diminuait avec une augmentation de la concentration en ETM (Cd, Cr, Cu et Zn) (Chandra and Kang, 2016). Une accumulation élevée en Mn peut entraîner son dépôt excessif dans les cellules photosynthétiques et pourrait donc potentiellement altérer le métabolisme cellulaire (Fernando et al., 2013). Une concentration foliaire élevée en Mn peut diminuer le taux net de la photosynthèse, la conductance stomatique, la concentration interne de dioxyde de carbone et la transpiration (Tavanti et al., 2019). Certains ETM tels que le Fe, le Cu, ou le Mn pourraient transférer un de leurs électrons sur une molécule d'oxygène, pour donner des ions superoxydes, induisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules végétales (Alloway, 2013; Bhaduri and Fulekar, 2012; Tchounwou et al., 2012). Lorsqu'ils sont en excès, les ROS entraînent de multiples effets toxiques comme la peroxydation des lipides, le clivage des protéines ou les dommages à l'ADN (Unyayar et al., 2006). Les ETM dans le sol peuvent aussi causer la perte de la couverture végétale par phytotoxicité (Kabata-Pendias, 2011). Au niveau des écosystèmes, les ETM ont un impact sur la biodiversité des microorganismes mais également sur leur abondance et leur fonction ou activité (Griffiths and Philippot, 2013).

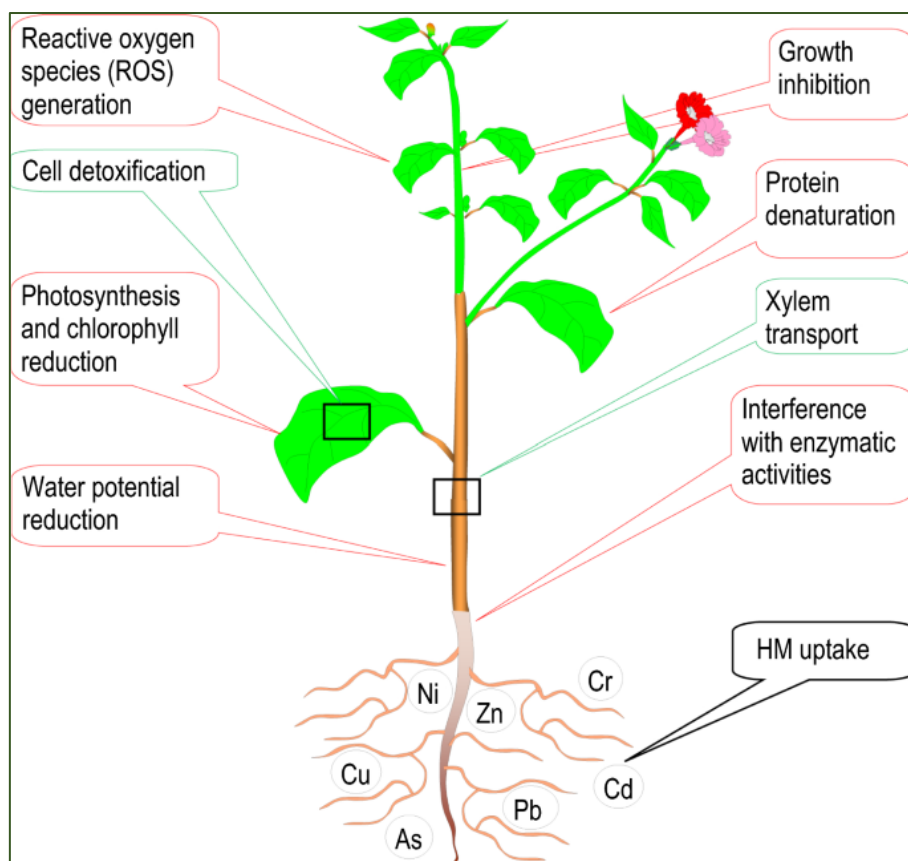


Figure 10 : Toxicité des ETM (nommé HM) chez les plantes et leurs stratégies de tolérance (absorption/translocation et détoxification) (Nedjimi, 2021).

Plusieurs risques environnementaux sont liés à l'entrée des ETM dans les végétaux à l'exemple de l'introduction des contaminants dans la chaîne alimentaire et qui peuvent à terme impacter la santé humaine. Les ETM comme l'As, le Pb et le Hg sont les trois premiers éléments sur la liste des substances dangereuses prioritaires recensées par l'Agence pour les substances toxiques et les maladies (ATSDR, 2020). Chez l'Homme, les voies d'entrées des ETM dans l'organisme sont le contact cutané, l'inhalation ou l'ingestion. En fonction de l'élément et de sa spéciation, des irritations ou des réactions allergiques localisées sont possible, ainsi qu'une pénétration dans les différentes couches de l'épiderme pouvant aller jusqu'à une diffusion systémique. Il existe un consensus qui permet d'affirmer que des ETM sont à l'origine de certains symptômes et de certaines maladies neurodégénératives telles que le Parkinson et l'Alzheimer dont les apparitions peuvent être accentuées par une contamination au Hg, neurologiques comme le saturnisme (troubles du système nerveux central et périphérique) causé par un excès de Pb, la maladie Itai-itai (problèmes rénaux et osseux) causée par un excès de Cd.

1.3 Revégétalisation des SSP

1.3.1 Phytomanagement / Phytostabilisation

La revégétalisation des SSP est un enjeu important en raison des nombreuses fonctions écologiques et de services écosystémiques fournis par les végétaux. Les végétaux permettent entre autres de :

- Limiter l'envol de poussières, le ruissellement, et le lessivage (Nwoko, 2010).
- Améliorer la fertilité du sol grâce à des apports de matières organiques (Mench et al., 2009).
- Maintenir ou restaurer une microflore et une microfaune adaptée (Jones, 2013).
- Gérer les flux d'eau grâce au phénomène de la transpiration et maintenir l'humidité de sol (Prieto et al., 2012).

L'utilisation des végétaux pour la gestion des SSP constitue une approche appelée phytomanagement. C'est une approche alternative innovante et intégrative considérant le sol contaminé non seulement comme un site à réhabiliter mais aussi comme une ressource à exploiter. Il regroupe un ensemble de techniques de génie écologique durables utilisant des espèces végétales *in-situ*; c'est le concept de phytoremédiation couplée à la valorisation de la biomasse (Cundy et al., 2015). La phytoremédiation est définie comme l'utilisation des végétaux associées ou pas à des microorganismes pour immobiliser, extraire, éliminer et/ou dégrader les contaminants inorganiques ou organiques dans les sols, les sédiments, les eaux, de surface ou souterraines (Ali et al., 2013). Elle comprend différents procédés dont les plus employés pour la gestion des ETM sont la phytostabilisation, la rhizofiltration, la phytoextraction, et la phytovolatilisation (Figure 11). La phytoextraction se définit comme l'utilisation de végétaux pour extraire des ETM du sol. La phytovolatilisation est l'utilisation des plantes pour absorber et transformer certains ETM du sol (tels que l'As, ou le Se), et les libérer dans l'atmosphère sous forme de composés volatils. La rhizofiltration est utilisée avec des plantes aquatiques pour absorber ou adsorber les ions des ETM des eaux souterraines et des eaux usées contaminées.

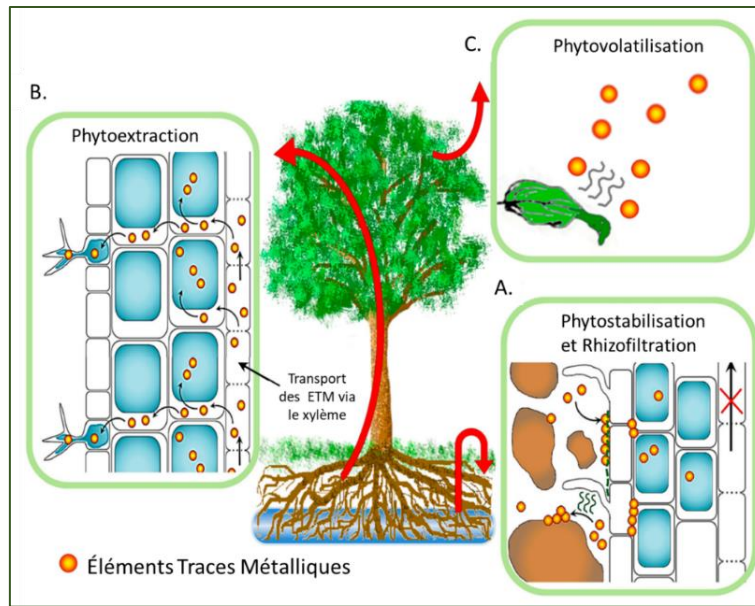


Figure 11 : Principales techniques de phytomanagement des ETM (adapté de DalCorso et al., 2019).

A. adsorption des ETM (points jaunes) sur les particules du sol ou les parois cellulaires (induite par le métabolisme de la rhizosphère) et la compartimentation des ETM dans les vacuoles des cellules racinaires (cercles bleus à l'intérieur des cellules), empêchant le transport vers la partie aérienne ; B. accumulation des ETM dans les organes aériens (par ex, dans les vacuoles ou les trichomes) lors du transport du xylème ; C. phytovolatilisation pour certains ETM (par exemple, As et Se), le métabolisme foliaire permet la volatilisation des composés toxiques.

La phytostabilisation est une technique de gestion qui vise à établir un couvert végétal et à inactiver *in situ* les ETM à l'aide de plantes excluantes, éventuellement en combinaison avec des amendements (phytostabilisation aidée) permettant ainsi de réduire la mobilité et la toxicité des contaminants (Figure 12).

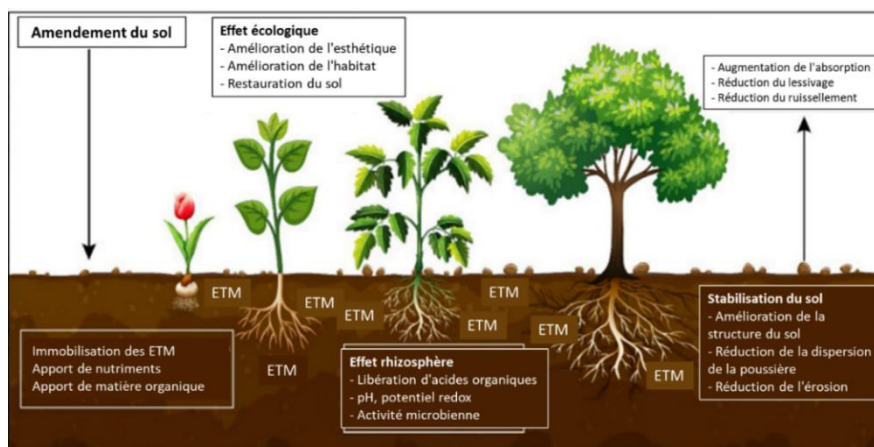


Figure 12 : Illustration des effets potentiels de la phytostabilisation sur des sols contaminés par des ETM (adapté de (Bolan et al., 2011))

Le couvert végétal sert à diminuer la dispersion éolienne réduisant ainsi drastiquement la mobilité de certains ETM. Dans une étude réalisée par (Faure et al., 2012), l'influence de la phytostabilisation sur la limitation de l'érosion éolienne et du transfert particulaire de l'As par envolée de poussières, a été évaluée grâce à un dispositif de type « tunnel à vent » sur un terrier de stockage des sous-produits industriels enrichis en ETM, situé à Salsigne en France. Les auteurs ont montré que le couvert végétal développé à 80% diminue la vitesse du vent mesurée au sol d'un facteur 2, et la quantité de poussières prélevées et le flux d'As qui lui est corrélé d'un facteur 13 environ (Tableau 3).

Tableau 3 : Influence du couvert végétal sur la vitesse du vent au sol, l'envolée de poussières et les flux d'arsenic sur le site de Salsigne.

Recouvrement végétal (%)	Vitesse du vent (m/s) à 125 mm du sol	Masse de poussières (g) collectée en 20 mn	Flux d'As (mg/h)
10	4,9	6,1	13,2
80	2,4	0,5	0,9

Les végétaux sélectionnés pour la phytostabilisation doivent retenir les ETM au niveau de leur rhizosphère et limiter leur transport vers les parties aériennes (Figure 13) afin d'éviter leur transfert vers la chaîne alimentaire (Sarwar et al., 2010). Les végétaux à sélectionner pour une revégétalisation réussie doivent présenter les caractéristiques suivantes : faciles à établir, croissance rapide, système racinaire profond, tolérance au climat local, tolérance aux conditions physico-chimiques défavorables, capacité à améliorer la fertilité du substrat par le biais de la matière organique et du cycle des nutriments (Maiti, 2012; Yan et al., 2020). Des études récentes considèrent la flore indigène comme une source potentielle de plantes candidates pour la phytostabilisation des sols contaminés par des ETM. Les espèces végétales indigènes poussant sur un site contaminé donné pendant une longue période sans intervention humaine possèdent certaines caractéristiques qui en font les mieux adaptées aux conditions locales sont à privilégier pour le phytomanagement (Gajić et al., 2018). Le peuplier (*Populus sp.*) et le saule (*Salix sp.*) sont les espèces ligneuses les plus utilisées en phytomanagement des SSP par des ETM (Ciadamidaro et al., 2017; Dickinson and Pulford, 2005; Meers et al., 2007b), en raison de la production élevée de biomasse aérienne et racinaire, ainsi que leur tolérance relative aux ETM. Ils ont démontré particulièrement une meilleure efficacité face aux ETM les plus mobiles tels que le Cd, Zn et B (Dickinson et al., 2009). Plusieurs autres essences ligneuses telles que le bouleau (*Betula sp.*), le charme (*Ostrya carpinifolia*), le chêne (*Quercus sp.*), le frêne (*Fraxinus*

excelsior) et l'érable (*Acer pseudoplatanus*), ont été examinées dans différentes études afin d'évaluer leurs comportements et caractéristiques d'adaptation à la contamination par des ETM (Ciadamidaro et al., 2019; Evangelou et al., 2013; Lewis et al., 2015; Mertens et al., 2007). Dans une expérience de terrain réalisée sur une période de 33 ans, avec différentes espèces ligneuses à savoir : *Populus robusta*, *Quercus robur*, *Fraxinus excelsior*, et *Acer pseudoplatanus*, il a été démontré que *P. robusta* est l'espèce qui a absorbé les quantités élevées de Cd et de Zn, associée à une augmentation des concentrations de Cd et de Zn dans la couche supérieure du sol, et que les autres espèces contenaient des concentrations foliaires normales de Cd, Cu, Cr, Pb et Zn (Mertens et al., 2007). Dans le cadre d'une étude conduite sur des sols contaminés par des ETM avec des concentrations élevées variables de Cu, Zn, Cd et Pb, ainsi qu'avec un sol témoin non contaminé, quatre espèces ligneuses : *S. viminalis*, *P. monviso*, *B. pendula* et *Q. robur*, ont été évaluées. Dans les sols contaminés, la biomasse a été réduite chez toutes les espèces, à l'exception du *Q. robur*. Il a été démontré une corrélation négative significative entre la biomasse et les concentrations foliaires de Cd et Zn, atteignant jusqu'à 15 mg/kg de Cd et 2000 mg/kg de Zn dans les feuilles *S. viminalis*. La plus forte accumulation de Pb a été observée dans les feuilles de *B. pendula* avec une concentration allant jusqu'à 78 mg/kg. Les auteurs ont donc suggéré que *B. pendula* pourrait convenir à la phytostabilisation de sols présentant des concentrations élevées en Cd et Zn mais faibles en Pb, tandis que *S. viminalis* et *P. monviso* pourraient être utilisés pour stabiliser des sols présentant des concentrations élevées en Cu et Pb mais faibles en Zn et Cd (Evangelou et al., 2013).

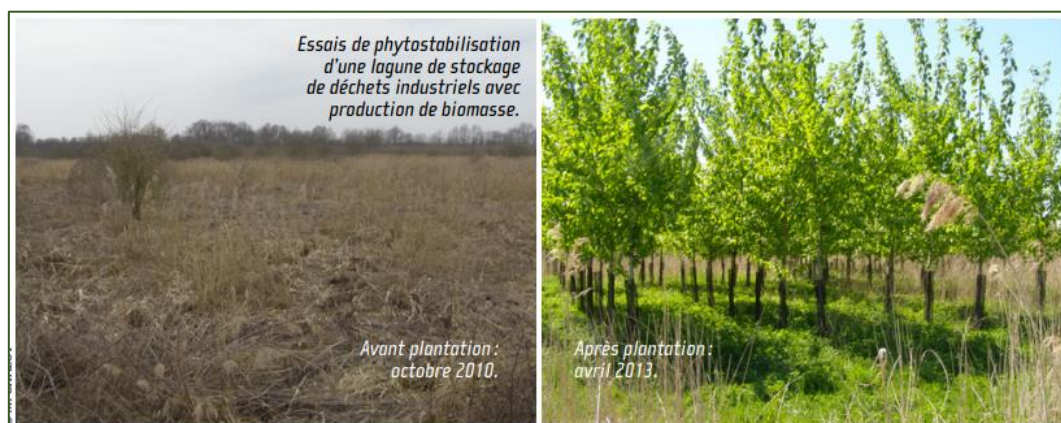


Figure 13 : Essais de phytostabilisation d'une lagune de stockage de sous-produits industriels, avec production de biomasse valorisable, site de Tavaux – SOLVAY (Chalot, données non publiées).

1.3.2 Phytostabilisation aidée / Biodynamisation

Les espèces végétales sélectionnées pour leur utilisation en phytomanagement peuvent présenter quelques limites, par exemple une croissance lente ou une faible biomasse qui peuvent limiter leurs applications rapides, à grande échelle, et une adaptation à diverses conditions des sols généralement pauvres en nutriments et riches en ETM (Gerhardt et al., 2017). Par conséquent, l'établissement des plantes doit souvent être aidé par un apport suffisant d'amendements permettant de dynamiser l'activité biologique et la fertilité du sol, dans le cadre de phytostabilisation : il est question alors de phytostabilisation aidée ou assistée (Gil-Loaiza et al., 2016).

La biodynamisation d'un sol consiste à renforcer son activité microbiologique, c'est-à-dire à renforcer l'action des bactéries qui stimulent la croissance des végétaux en améliorant les conditions microbiologiques et agronomiques locales. Elle peut se faire par un amendement biologique tel que l'inoculum bactérien biodynamisant directement, ou par un amendement organique qui peut notamment apporter des éléments carbonés indispensables à l'instauration d'un microbiote adapté. Plusieurs types d'amendements ont été utilisés pour une meilleure biodynamisation et une phytostabilisation plus efficace des ETM en fonction de leurs caractéristiques (Hussain Lahori et al., 2017; Kabas et al., 2012). Le choix de l'amendement dépend généralement de type de contamination, du pH, des teneurs en nutriments et en MO, des (hydr)oxydes de Fe, Mn et les argiles dans le sol. Les amendements les plus efficaces (ou leurs composés dérivés après réaction dans le sol) sont ceux permettant de générer une grande surface réactive, ayant une action rapide et durable, étant peu coûteux et disponibles dans le commerce, faciles à utiliser sans effet négatif sur le sol et les plantes, étant sans danger pour les travailleurs, et conformes à la législation (Bolan et al., 2011; Kumpiene et al., 2008; Palansooriya et al., 2020).

1.3.2.1 Les amendements organiques

Le digestat est l'un des sous-produits de la digestion anaérobie (méthanisation) des résidus organiques, l'autre étant la production de biogaz. La méthanisation peut se faire à partir d'une multitude de matières par exemple des déjections animales, déchets vert, bio-déchets, ordures ménagères, sous-produits animaux, qui servent à la fois de substrat et d'ensemencement en microorganismes du méthaniseur. La diversité des matières méthanisées fait qu'il existe une diversité des digestats produits. La qualité agronomique des digestats en est influencée en

termes de teneurs en éléments fertilisants et ETM. La norme *NF U 44-051* titrée *Amendements organiques – Dénominations spécifications et marquage* homologuée en avril 2006 et amendée en décembre 2010 fixe des teneurs limites en ETM, HAP, en micro-organismes, et en éléments inertes et impuretés, ainsi que des flux maximums annuels moyens sur 10 ans pour les ETM et HAP des digestats et les autres amendements organiques (Tableau 4).

Tableau 4 : Dose maximale préconisée pour les amendements organiques (NF U 44-051, 2010).

Flux et teneurs limites en éléments et composés traces			
	Élément ou composé	Valeur limite (mg/kg de MS)	Flux maximal par an (g/ha)
ETM	As	18	270
	Cd	3	45
	Cr	120	1800
	Cu	300	3000
	Hg	2	30
	Ni	60	900
	Pb	180	2700
	Se	12	180
	Zn	600	6000
HAP	Fluoranthène	4	6
	Benzo(b)fluoranthène	2.5	4
	Benzo(a)pyrène	1.5	2
Valeurs limites en microorganismes d'intérêt sanitaire			
Agents indicateurs de traitement	<i>Escherichia coli</i>	10 ² /g MB	
	Entérocoques	10 ⁴ /g MB	
Agents pathogènes	Œufs d'helminthes viables	Absence dans 1,5 g MB	
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1 g MB	
Valeurs limites en inertes et impuretés			
Inertes et impuretés		Valeurs limites	
Films + PSE > 5 mm		< 0,3 % MS	
Autres plastiques > 5 mm		< 0,8 % MS	
Verres + Métaux > 2 mm		< 2 % MS	

Le digestat a une teneur élevée en matière organique, est très riche en nutriments tels que le N, P, K, et Ca (Lošák et al., 2012) ; des éléments qui sont très importants pour le développement des plantes, en améliorant la qualité agronomique et la structure du sol, en augmentant sa capacité de rétention d'eau et en stimulant l'activité microbienne (Levén, 2006).

De plus amples informations sur les propriétés du digestat et des exemples d'application ont été rapportées dans les revues de (Makádi et al., 2012; Möller and Müller, 2012). Plusieurs autres études ont rapporté les effets positifs de l'application de digestat sur la fertilité des sols, et l'amélioration de la croissance et rendement des cultures (Arthurson, 2009; Gunnarsson et al., 2010; Stinner et al., 2008). Le résultat final n'est donc pas seulement une augmentation de la qualité du sol, mais aussi un rendement plus élevé des cultures et une meilleure quantité et qualité de la biomasse par rapport à un sol non fertilisé (Odlare, 2005). Dans une étude de 3 ans menée sur le terrain avec les plantes luzerne et dactyle, il est à noter une nette amélioration de la croissance des plantes. Le rendement moyen de la luzerne cultivée sur un sol amendé au digestat à la fin de chaque année était supérieur au control de 2,8, 35,3 et 67,2 %. Pour le dactyle, la biomasse a augmenté de 19,7% et de 36.6% les 2 premières années tandis qu'à la troisième année, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements digestat et le control non fertilisé (Montemurro et al., 2010). Dans une autre étude avec la laitue (*Lactuca sativa*), le digestat a augmenté de 52,9% le rendement commercialisable au cours de trois années expérimentales par rapport au témoin non fertilisé (Panagos et al., 2013). (Tayibi et al., 2021) ont montré que le digestat liquide (170 kg N/ha) et la combinaison de digestat liquide (170 kg N/ha) et solide (à 50 t/ha) ont un effet positif significatif sur les taux de germination relative des graines et sur la croissance par rapport au substrat non amendé (Figure 14). En revanche, À 100 t/ha le digestat solide a causé l'inhibition initiale de la germination, et la croissance des plantes en termes de biomasse sèche aérienne était équivalente à 50 t/ha.

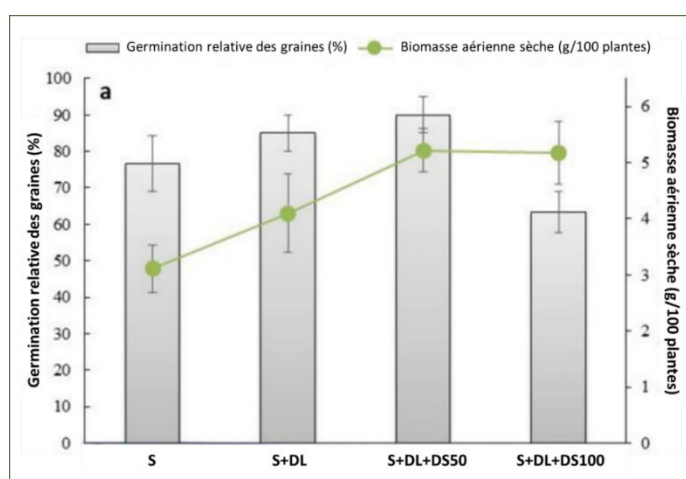


Figure 14 : Impact du digestat sur la germination des graines après 10 jours de semis et la biomasse aérienne de blé après 24 jours de semis (Tayibi et al., 2021).

S : Sol non amendé, S+DL : Sol + digestat liquide (170 kg N/ha),
 S+DL+DS50 : Sol + digestat liquide (170 kg N/ha) + digestat solide (50 t/ha),
 S+DL+DS100 : Sol + digestat liquide (170 kg N/ha) + digestat solide (100 t/ha).

Sur un sol sableux alcalin pauvre en nutriment échantillonné à Grugliasco en Italie, (Cristina et al., 2020) ont rapporté des effets bénéfiques de digestat sur différents paramètres de croissance des plants de tomates (*Solanum lycopersicum*), révélant une augmentation de la biomasse et de la hauteur jusqu'à 37,5 et 6 fois par rapport au contrôle non traité (Figure 15). L'application de digestat a aussi induit un enrichissement du sol en nutriments et en matière organique dans cette expérience en serre réalisée pendant trois mois durant la saison estivale dans une serre du Centre de Compétence AGROINNOVA à l'Université de Turin en Italie.

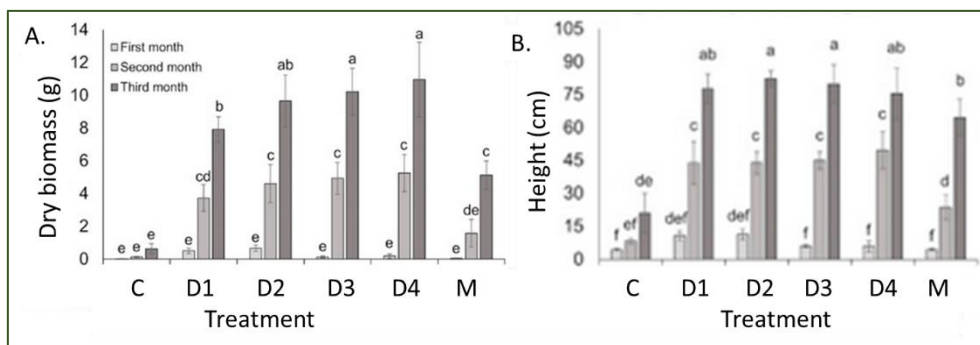


Figure 15 : A. Biomasses sèches et B. hauteur de *Solanum lycopersicum* avec différents traitements durant trois mois (Cristina et al., 2020).

Les différents traitements sont : C = Control, Digestat liquide (D1 = Digestat primaire et D2 = digestat secondaire), Digestat solide (D3 = digestat centrifugé et D4 = digestat séché) et M = engrais minéral. Des lettres différentes indiquent des différences entre les traitements qui sont significatives à $P < 0,05$ (Tukey HSD). Chaque barre d'erreur représente un écart-type.

Le digestat peut directement ou indirectement modifier la distribution et la disponibilité des ETM dans le sol, soit en formant des complexes entre les ligands organiques et les ETM, soit en impactant les propriétés physico-chimiques et microbiennes du sol qui agissent sur la biodisponibilité des ETM. Le digestat peut être un moyen de réduire les niveaux d'ETM dans le sol car, par son ajout, il est possible de diluer les niveaux de toxicité du sol (Mench et al., 2018; Zhang et al., 2014). Le digestat peut aussi promouvoir le fonctionnement et la diversité de la communauté microbienne du sol (Makádi et al., 2012), en les stimulant en raison de la présence de nutriments inorganiques et des matières organiques (Odlare, 2005). Le digestat augmente de façon équivalente voire meilleure que les fertilisants organiques plus classiques tels que les composts, la biomasse bactérienne, l'activité respirométrique, l'activité nitrifiante, et l'activité enzymatique en général (Nyberg et al., 2004; Odlare et al., 2008). Sachant que les activités enzymatiques du sol sont sensibles aux changements microbiens causés par le stress lié aux ETM et sont strictement liées aux cycles des nutriments du sol, certains ETM notamment le Cu et le Pb se lient fortement à la matière organique apporté par le digestat, ce qui diminue

leurs impacts sur les activités enzymatiques du sol (Xian et al., 2015). Donc l'apport du digestat sur un sol contaminé avec des ETM permet l'augmentation de la biomasse microbienne (Jedidi et al., 2004; Leifeld et al., 2002) et diverses activités enzymatiques du sol, à l'exemple de l'uréase, de la phosphatase alcaline ou de la β -glucosidase (Blagodatsky and Richter, 1998; Liang et al., 2003). Sur un essai de terrain de 4 ans réalisé à l'est de la Suède sur de cultures de l'orge et de l'avoine, les effets de digestat sur des variables chimiques et microbiologiques du sol ont été évalués (Odlare et al., 2008). Dans cette étude, comparé au sol non amendé, le digestat a permis une forte augmentation de la respiration induite par le substrat de 11%, indicatrice de la biomasse microbienne. Le digestat a augmenté aussi le taux d'oxydation potentiel de l'ammoniac et la capacité de minéralisation de l'azote de 19%, ainsi que la constante de vitesse de croissance spécifique des dénitrifiants de 20%. Dans cette étude, les changements des propriétés microbiennes du sol se sont produits plus rapidement que la plupart des propriétés chimiques, suggérant que les processus microbiens seraient des indicateurs plus sensibles à des changements à court terme que des propriétés physico-chimiques du sol. Dans une étude récente réalisée par (Gielnik et al., 2019), le digestat utilisé comme un nutriment potentiel et un ensemencement microbien pour la gestion des sols contaminés, a amélioré la respiration microbienne (Figure 16) et a entraîné le développement des groupes microbiens spécifiques dans le sol amendé.

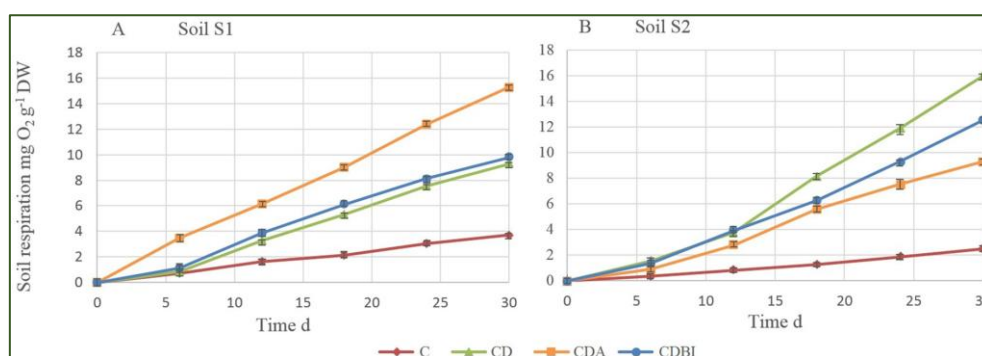


Figure 16 : Respiration microbienne dans des sols amendés avec du digestat (Gielnik et al., 2019)

Le sol S1 utilisé dans l'expérience a été obtenu à partir d'un site de raffinerie de pétrole situé dans le nord-est de la France (Dunkerque) et le sol S2 provenait d'un site industriel contaminé par des huiles de moteur (Lyon, France). Les 4 traitements : C : sol + eau ; CD : sol + digestat ; CDA : sol + digestat + agent gonflant ; CDBI : sol + digestat + bactéries immobilisées sur de biochar. Moyenne (n = 3) et écart-type.

1.3.2.2 Les amendements biologiques

La biodynamisation du sol pour un phytomanagement efficace peut impliquer l'utilisation de « bactéries favorisant la croissance des plantes » (PGPR pour Plant Growth Promoting Rhizobacteria) qui sont capables de coloniser le système rhizosphérique, d'offrir une protection contre les stress biotiques et abiotiques, et d'influencer positivement la croissance, le développement, la productivité et la nutrition minérale des plantes (Pascale et al., 2020). Les PGPR selon la souche microbienne et l'espèce végétale, peuvent stimuler directement la croissance et le développement des plantes par des mécanismes tels que l'absorption des nutriments ou l'augmentation de la disponibilité des nutriments par la fixation de N, la minéralisation des composés organiques, la solubilisation des nutriments minéraux et la production de phytohormones (Bhardwaj et al., 2014). Ils peuvent aussi agir indirectement en empêchant ou en neutralisant les effets délétères des phytopathogènes sur les plantes par la production des substances répressives qui augmentent la résistance naturelle de l'hôte, et en aidant les plantes à croître activement en cas de stress environnemental (stress abiotique) ou à protéger les plantes des infections (stress biotique) par la production d'enzymes hydrolytiques (chitinases, cellulases, protéases, etc.), de divers antibiotiques (2,4-diacétylphloroglucinol, phénazines, pyrroles etc.), ou de sidérophores (Gouda et al., 2018). Ces différents mécanismes sont résumés dans la (Figure 17).

Les mécanismes de promotion de la croissance des plantes par les microorganismes	
Directs	Indirects
Amélioration de la nutrition <ul style="list-style-type: none"> ✓ Fixation d'azote ✓ Solubilisation du phosphate inorganique ✓ Chélation du fer 	Antagonismes-vis-à-vis des agents pathogènes <ul style="list-style-type: none"> ✓ Sidérophores ✓ Antibiotiques ✓ Compétitions
Production d'Hormones <ul style="list-style-type: none"> ✓ Auxines ✓ Gibbérellines ✓ Cytokinines ✓ Zéines 	Induction de résistance/tolérance systémique <ul style="list-style-type: none"> ✓ Lignification des parois cellulaires végétales ✓ Dépôts de callose ✓ Accumulation de composés phénoliques ✓ Protéines PR ✓ Phytoalexines
	Diminution du « stress éthylènes » <ul style="list-style-type: none"> ✓ Résistance aux pathogènes et à la maladie ✓ Résistance aux métaux lourds ✓ Résistance au stress salin/hydrique

Figure 17 : Les mécanismes de promotion de la croissance des plantes par les microorganismes.

De nombreuses études ont permis d'identifier et de caractériser plusieurs espèces comme des PGPR. Parmi ces PGPR, il y a celles appartenant au genre *Pseudomonas* (David et al., 2018; Qessaoui et al., 2019), *Bacillus* (Akinrinlola et al., 2018; Hashem et al., 2019), *Arthrobacter* (Sun et al., 2022; Zhang et al., 2020), *Phyllobacterium* (Breitkreuz et al., 2020; Bresson et al., 2013) et *Variovorax* (Garcia Teijeiro et al., 2020; Sun et al., 2018). Une souche unique PGPR peut avoir un effet positif, cependant un consortium formé de plusieurs PGPR, peut offrir plus d'avantages grâce aux interactions entre les souches (Backer et al., 2018). Bien que les PGPR peuvent améliorer la croissance des plantes même dans des conditions de stress hydrique et/ou métallique (Figure 18) par différents mécanismes et processus (Figure 17), il existe divers facteurs environnementaux qui peuvent impacter leurs activités. Les facteurs environnementaux tels que les conditions météorologiques, les caractéristiques du sol ou la composition et l'activité de la flore microbienne indigène du sol ont tous un rôle dans la réussite de l'installation des PGPR (Gupta et al., 2015).

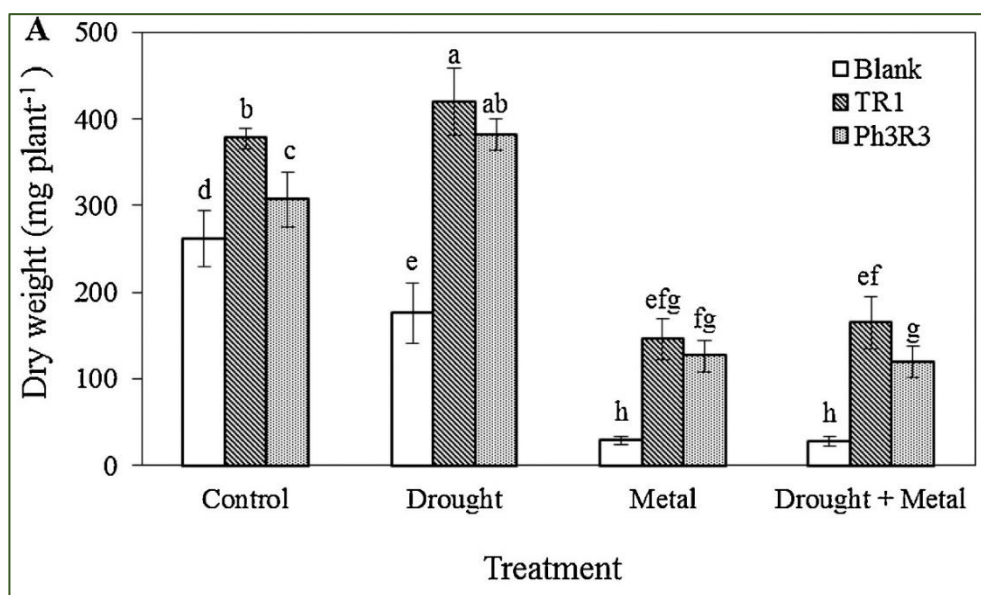


Figure 18 : Effet de l'inoculation de *Pseudomonas libensis* (TR1) et de *Pseudomonas reactans* (Ph3R3) ou sans inoculation (Blank) sur la masse sèche de *Brassica oxyrrhina* (Ma et al., 2016)

Les quatre traitements sont : i) optimal de croissance soit un arrosage fixé à 100 % de la capacité de rétention en eau du sol et non enrichi en Zn et Cu (Control), ii) 50 % de la capacité de rétention en eau du sol et non enrichi en Zn et Cu (Drought), iii) 100 % de la capacité de rétention en eau du sol et un sol enrichi en Cu (400 mg/kg) et en Zn (500 mg/kg) (Metal), et iv) 50 % de la capacité de rétention en eau du sol et un sol enrichi en Cu (400 mg/kg) et en Zn (500 mg/kg) (Drought + Metal).

Dans des sols contaminés par des ETM, les bactéries sont les premières à réagir aux ETM, et donc les métabolismes bactériens peuvent être à l'origine de transformation ou des changements de spéciation des ETM (Bolan et al., 2013). Les PGPR ont développé de nombreuses résistances contre les ETM. Parmi les mécanismes de résistance, il y a les transporteurs spécifiques à un ETM ou à spectre large, des oxydases ou des réductases qui transforment un ETM en un composé volatile ou un composé moins toxique ou encore des structures extracellulaires permettant d'immobiliser le composé toxique (Ullah et al., 2015).

Les bactéries associées aux plantes peuvent modifier la toxicité, la solubilité, la disponibilité et la mobilité des ETM y compris les nutriments N, P, K par la réduction du pH du sol, la libération de chélateurs, la solubilisation du P ou les changements redox. Parmi les différents métabolites produits par les PGPR, les sidérophores jouent un rôle significatif dans la mobilisation des ETM et leur accumulation dans les plantes (Rajkumar et al., 2012). De nombreux mécanismes microbiens peuvent intervenir sur la mobilité des ETM dans les sols : solubilisation, insolubilisation, ou volatilisation. La solubilisation des ETM peut se faire par acidification, chélation et dissolution induite par les ligands. Elle se traduit par une dissolution d'(oxy)hydroxydes des ETM tels que le Fe, le Mn, le S ainsi que des éléments qui leur sont associés, ou par modification des conditions de milieu (pH, Eh). Ceci peut s'observer sur d'anciens sites miniers où l'oxydation des sulfures tels que la pyrite (FeS_2), l'arsénoxyrite (FeAsS) ou la galène (PbS) par des bactéries, libère les ETM associés. Les bactéries peuvent aussi solubiliser les ETM par exemple les Zn, Ni et Cu insolubles par acidification locale du sol en sécrétant des protons et/ou des anions organiques comme l'acétate, le lactate, l'oxalate, le tartrate, le succinate, le citrate, le gluconate, le cétogluconate, ou le glycolate (DalCorso et al., 2019). Les bactéries productrices de sidérophores peuvent aussi impacter la mobilité du Fe en formant des complexes [Fe^{3+} -sidérophores] microbiens qui peuvent être facilement absorbés par les racines des plantes (Rajkumar et al., 2010). Les composés chélateurs organiques éliminent les ions d'ETM des sites d'absorption et des réseaux minéraux et les protègent ainsi de la résorption. La réduction des espèces de valence plus élevée peut entraîner une mobilisation, par exemple de Mn(IV) en Mn(II), ou une immobilisation, par exemple de Cr(VI) en Cr(III) (Gadd, 2004). L'insolubilisation se traduit par la formation de composés insolubles ou par la précipitation des ETM par une biodégradation des complexes organométalliques solubles. La volatilisation de certains ETM (As, Hg, Se, Sb) se traduit par la méthylation ou par la réduction. Les bactéries méthylantes du Hg peuvent transformer le HgS stabilisé par la matière organique dissoute dans les sols en méthylmercure (Graham et al., 2012). Les bactéries

contenant des gènes *arsM*, qui sont abondants dans le sol, sont responsables de la méthylation de l'As avant son absorption par les plantes (Jia et al., 2013). D'autres bactéries sont signalées comme sécrétant des composés polymères tels que les polysaccharides qui contribuent à la phytostabilisation des ETM en réduisant leur mobilité (Rajkumar et al., 2012).

Les bactéries du sol peuvent aussi aider à mobiliser ou immobiliser le Mn selon les conditions du sol (Marschner, 2011). Dans un sol peu aéré, les bactéries peuvent rendre mobile le Mn par réduction des oxydes de Mn. A contrario, les bactéries Mn-oxydantes vont diminuer la disponibilité du Mn dans les sols aérés. La réduction du Mn insoluble en sa forme soluble Mn(II) se fait donc par des processus biotiques (bactéries réductrices) en plus des processus abiotiques (matière organique). L'oxydation quant à elle, se réalise par le biais de processus biologiques ou peut être autocatalytique. C'est cette balance de réactions d'oxydo-réductions du Mn par les microorganismes qui va le rendre plus ou moins biodisponible pour la plante (Figure 19).

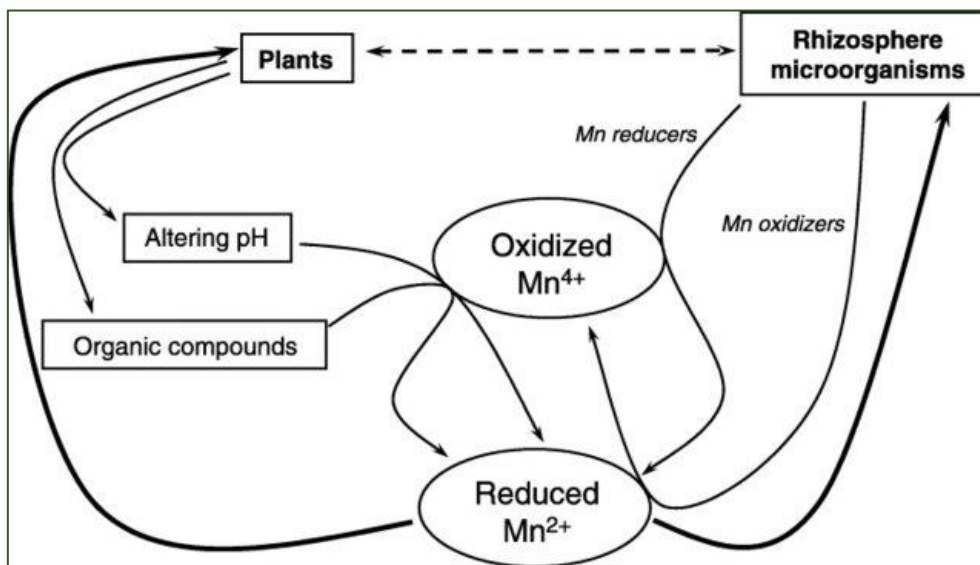


Figure 19 : Mécanismes microbiens et végétaux pour augmenter la disponibilité du Mn dans la rhizosphère (Rengel and Marschner, 2005).

Les plantes peuvent modifier le pH de la rhizosphère par acidification et exsuder des composés organiques qui peuvent convertir le Mn oxydé et complexé, en une forme réduite, disponible pour les plantes. Les micro-organismes peuvent oxyder ou réduire le Mn, altérant ainsi sa disponibilité pour les plantes. Les flèches épaisses représentent l'absorption du Mn.

Parmi les amendements biologiques, il y a l'utilisation des champignons qui ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes et donc sur le sol (Ciadamidaro et al., 2017). Ils se répartissent en deux groupes : les champignons endophytes et les champignons mycorhiziens :

- Les champignons endophytes racinaires sont des organismes mutualistes et peuvent donc établir des interactions mutuellement bénéfiques avec les plantes. Parmi les champignons endophytes, les plus souvent retrouvés dans les racines sont les « Endophytes bruns septés (Dark Septate Endophyte ou DSE) ». Ces champignons, appartenant au phylum des Ascomycètes, forment des structures mélanisées typiques inter- ou intracellulaires appelées microsclérotés (Mandyam and Jumpponen, 2005). En effet, les DSE augmentent la teneur en éléments nutritifs et améliorent la croissance des plantes (Schulz and Boyle, 2006; Usuki and Narisawa, 2007) ; ils ont la capacité de décomposer la matière organique complexe (Caldwell et al., 2000) et sont couramment observés dans les racines des plantes dans des environnements stressants (Fujimura et al., 2008; Soleimani et al., 2010), contaminés par des ETM (Berthelot et al., 2016; Regvar et al., 2010) ou carencés en éléments nutritifs (Khidir et al., 2010).

- Les champignons mycorhiziens établissent une symbiose obligatoire avec les racines de la plante. Le champignon fournit de l'eau et des sels minéraux (N, P, et K) à la plante et en échange la plante lui donne du carbone sous forme de photosynthétats (Wang et al., 2010). De plus, ces champignons ont un rôle actif pour la biodisponibilité des ETM des sols, soit en augmentant la phytoextraction, soit en la diminuant par la séquestration des ETM (Cabral et al., 2015). On distingue deux types de champignons mycorhiziens à savoir les ectomycorhiziens et les endomycorhiziens.

* Les champignons ectomycorhiziens sont surtout connus pour former des fructifications qui se développent en milieu forestier (Anderson and Cairney, 2007). Ces champignons ectomycorhiziens appartenant aux Ascomycètes ou Basidiomycètes, colonisent exclusivement les arbres et arbustes (Smith and Read, 2010). Les plantes associées aux champignons ectomycorhiziens poussent généralement dans des environnements pauvres en éléments nutritifs, dans les régions boréales, tempérées et montagneuses (Suz et al., 2015).

* Contrairement aux champignons ectomycorhiziens, les endomycorhiziens sont caractérisés par l'absence de manchon mycélien externe et par la pénétration des hyphes fongiques dans les cellules corticales (Bago et al., 1998). Ils comprennent les endomycorhizes des Orchidées et des Éricacées, les endomycorhizes des Cistacées, et les mycorhizes à arbuscules (Arbuscular Mycorrhizal Fungi : AMF pour champignons mycorhiziens arbusculaires) (Reddy and Saravanan, 2013). La symbiose mycorhizienne à arbuscules est la plus largement répandue. Elle se fait entre des champignons du groupe des *Gloméromycètes*, et un très grand nombre d'espèces végétales. Les AMF sont capables d'hydrolyser le P organique

en P inorganique pour le transférer à la plante hôte (Koide and Kabir, 2000), élément particulièrement difficile à prélever autrement. Globalement, la symbiose permet une amélioration de la croissance des plantes dans un sol non fertile en augmentant la surface d'échange entre la plante et le sol (Fall et al., 2022) et améliore la nutrition phosphatée (Kobae, 2019). Les AMF améliorent aussi la phytostabilisation (Janoušková et al., 2006) ou la phytoextraction des ETM (Arwidsson et al., 2009) en raison de leur potentiel à exsuder des agents chélateurs, en changeant la disponibilité des ETM par la modification du pH du sol (Hassan et al., 2013; Rajkumar et al., 2012). Les AMF peuvent aussi interagir avec des PGPR pour améliorer les propriétés et la qualité du sol (Jeffries et al., 2003). Par exemple, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont très souvent associées aux hyphes mycéliens pour se déplacer d'une plante à une autre, ou d'atteindre des zones du sol riche en nutriments, qui seront alors prélevés par les bactéries, et transférés à la plante au travers des réseaux mycéliens (Rashid et al., 2016).

1.3.2.3 Approches « omiques » pour le phytomanagement des SSP

Les approches « omiques » sont des technologies comprenant la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique (Figure 20). Ces technologies ont ouvert de nouvelles stratégies et opportunités dans la gestion de l'environnement (Mench et al., 2009). Elles permettent par exemple d'évaluer la diversité, la nature, la structure, la dynamique et la composition des communautés microbiennes et végétales, ainsi que d'analyser des nouveaux gènes d'intérêts et des enzymes clés (Chandran et al., 2020; Gutleben et al., 2018). Les approches « omiques » peuvent être utilisées pour comprendre les interactions tripartites entre les plantes, les bactéries et les ETM au niveau moléculaire. L'approche génomique permet d'identifier un individu étudié, par le séquençage de son génome entier. L'approche transcriptomique qui est l'étude de l'ensemble des ARN messagers produits lors du processus de la transcription d'un génome, génère d'énormes jeux de données mais reste incomplète sans l'implication de l'aspect protéomique qui est directement responsable de l'activité cellulaire. L'approche protéomique contribue avec succès à la reconnaissance et à la caractérisation des principales protéines des plantes et microorganismes jouant un rôle clé dans la solubilisation et la translocation des ETM. L'approche métabolomique permet d'étudier l'ensemble des métabolites produites. Une récente revue de (Mashabela et al., 2022) met en évidence les développements de la métabolomique pour étudier les interactions tripartites Plante-PGPR-ETM.

Dans le cadre de phytomanagement des SSP par des ETM, les approches « omiques » peuvent permettre d'élargir considérablement l'identification des protéines et gènes d'intérêts liées à la solubilisation des ETM, d'étudier les réponses métaboliques végétales et microbiennes aux niveaux cellulaire, biochimique et moléculaire, de comprendre les mécanismes d'exclusion, de tolérance, ou d'accumulation mises en place par les bactéries et les végétaux, et d'identifier les gènes et ligands impliqués dans l'absorption, la translocation et la tolérance des ETM dans les plantes. Ces gènes présentent un potentiel pour l'utilisation ciblée de consortiums plantes-microbes dans le phytomanagement. Dans un article de revue récent (Raza et al., 2020), les auteurs ont décrit l'apport des approches « omiques » dans la compréhension des processus métaboliques impliqués dans la tolérance au Cd dans les cultures régulières et les plantes hyperaccumulatrices. De même (Chandran et al., 2020; Dalal et al., 2020) détaillent les différentes techniques modernes utilisées dans les approches « omiques » pour étudier la biodiversité microbienne et évaluer le phytomanagement.

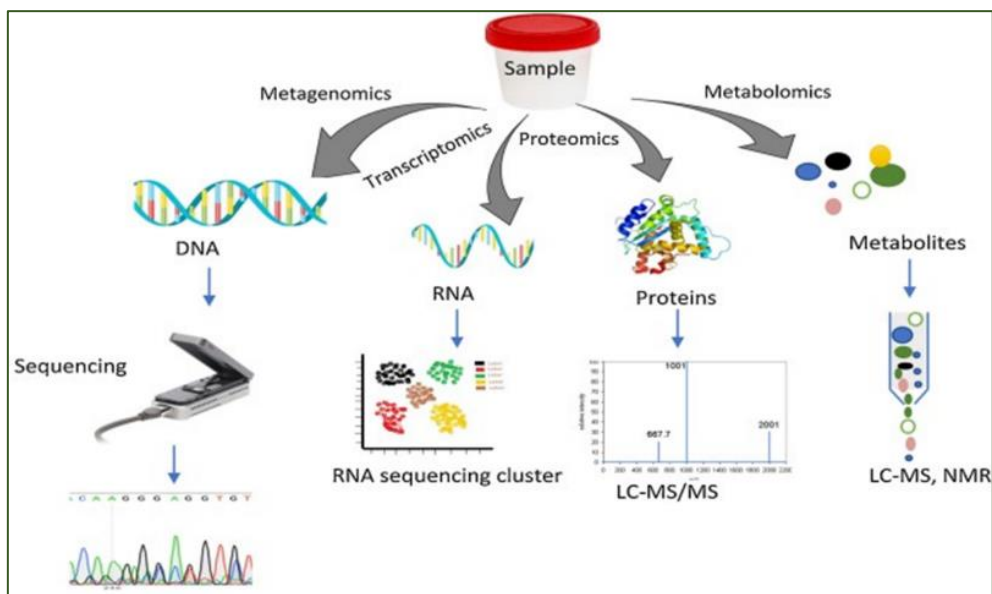


Figure 20 : Approches « omiques » (Dalal et al., 2020).

Dans cette figure, il est expliqué que la technologie multi-omique peut permettre en utilisant l'approche métagénomique de séquencer le génome complet, différents types d'ARN peuvent être quantifiés à l'aide de l'ARNseq en utilisant l'approche transcriptomique, les marqueurs de protéines peuvent être reconnus en utilisant l'approche protéomique et les changements métaboliques en termes de métabolites pourraient être identifiés en utilisant l'approche métabolomique.

Il existe des approches « omiques » plus intégratives à l'exemple de la protéogénomique qui est à l'interface de la protéomique et de la génomique. Dans cette approche (Figure 21), les données génomiques (séquençage de l'ADN, étiquettes de séquences exprimées (EST)) et transcriptomiques (RNA-Seq, profilage des ribosomes) sont utilisées pour générer des bases de données de séquences protéiques personnalisées afin de faciliter l'interprétation des données protéomiques (LC-MS/MS). À leur tour, les données protéomiques fournissent une validation au niveau des protéines des données d'expression des gènes, et aident à affiner les modèles de gènes. Les modèles de gènes améliorés peuvent contribuer à améliorer les bases de données de séquences protéiques pour l'analyse protéomique traditionnelle (Nesvizhskii, 2014). Dans certaines études, des approches transcriptomiques et protéomiques ont été combinées pour déchiffrer les réponses moléculaires. Dans une étude protéo-transcriptomique, les cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae* stressées par des ETM de terres rares ont exprimé plus de 1924 gènes différents comparés aux cellules témoins non stressées (Grosjean et al., 2022).

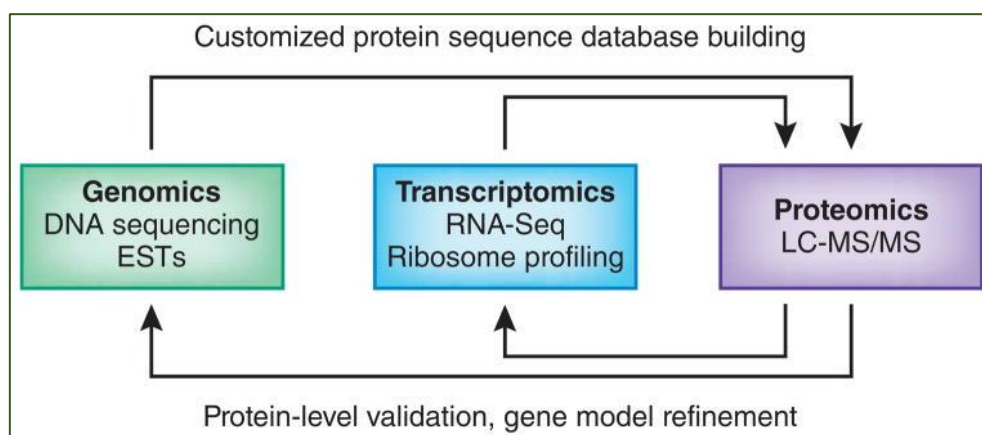


Figure 21 : Le concept de protéogénomique (Nesvizhskii, 2014).

1.3.2.4 Autres stratégies pour biodynamiser les SSP

D'autres stratégies sont utilisées pour biodynamiser les SSP afin d'améliorer les performances des arbres, nous avons par exemple l'utilisation des nanoparticules, du génie génétique ou du génie moléculaire (DalCorso et al., 2019).

- Les nanoparticules ont également été prises en compte pour leur utilisation possible dans l'aide au phytomanagement. Différents types de nanomatériaux ont été appliqués pour la décontamination de substrats pollués par des ETM grâce à leur capacité d'absorption ou à leur activité redox (Mueller and Nowack, 2010; Song et al., 2019).

- Le génie génétique s'est révélé être une technique prometteuse pour améliorer les capacités des plantes. Pour modifier génétiquement les plantes, une source étrangère de gènes provenant d'un organisme, tel qu'une espèce végétale, bactérienne ou animale, est transférée et insérée dans le génome d'une plante cible (Yan et al., 2020). Les technologies de l'ADN recombinant actuellement utilisées pour la transformation du génome nucléaire et cytoplasmique pour différentes espèces végétales permettent le transfert de déterminants souhaitables d'une espèce végétale à une autre. Par exemple, le génie génétique peut être exploité pour améliorer la tolérance aux ETM ou leur accumulation par l'introduction de gènes responsables de l'absorption, du transport, de l'accumulation et de la détoxification des ETM (Fasani et al., 2018). D'où la nécessité de caractériser les gènes impliqués dans ces différents processus de phytomanagement. Des peupliers deltoïdes (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsh.) ont été génétiquement modifiés par l'introduction des gènes bactériens merA (mercuric ion reductase qui réduit le Hg²⁺ en Hg⁰, moins toxique, qui est volatilisé par les plantes) et merB (organomercury lyase qui convertit le Hg organique en Hg²⁺) isolés et modifiés à partir d'*Escherichia coli*. In vitro, les plantes merA/merB étaient plus résistantes à l'acétate phénylmercurique que les témoins de type sauvage et pouvaient détoxifier plus efficacement le Hg organique (Lyyra et al., 2007). Des peupliers Bonghwa (*Populus alba* x *P. tremula* var. *glandulosa*) génétiquement modifiées exprimant le gène ScYCF1 de la levure (*Saccharomyces cerevisiae* - yeast cadmium factor 1), codant pour un transporteur vacuolaire impliqué dans la séquestration des ETM dans la vacuole ont présenté des symptômes de toxicité au Cd réduits et ont accumulé beaucoup plus de Cd, Zn et Pb que les plantes sauvages (Shim et al., 2013).

1.3.3 Suivi de la végétation par télédétection

1.3.3.1 Généralités

La télédétection est l'acquisition d'informations sur un objet ou un phénomène sans contact physique avec l'objet. C'est le processus de détection et de surveillance des caractéristiques physiques d'une zone en mesurant le rayonnement réfléchi et émis à distance (Goswami et al., 2022). Les capteurs à distance recueillent des données en détectant l'énergie qui est réfléchie par la Terre, dans une ou plusieurs longueurs d'onde données. Ces capteurs peuvent être placés sur des satellites ou montés sur des avions ou drones. La télédétection peut être passive ou active (Figure 22). Les capteurs passifs enregistrent le rayonnement émis ou réfléchi par l'objet ou les zones environnantes. La source la plus courante de rayonnement détectée par les capteurs passifs est la lumière solaire réfléchie. La photographie sur film,

l'infrarouge, les dispositifs à couplage de charge et les radiomètres sont des exemples de capteurs passifs. Les capteurs actifs émettent de l'énergie afin de balayer des objets et des zones en dégageant un rayonnement électromagnétique vers la cible. Le rayonnement réfléchi par la cible est alors perçu et mesuré par le capteur. Le RADAR (radio detection and ranging) et le LiDAR (light intensity detection and ranging) sont des exemples de télédétection active où le délai entre l'émission et le retour est mesuré, ce qui permet de déterminer la localisation, la vitesse et la direction d'un objet (Zheng and Moskal, 2009). La capacité technique des systèmes de capteurs peut être énumérée en 3 résolutions. **La résolution spatiale** concerne la taille de la cellule de résolution sur le terrain dans la direction du vol et transversalement. La taille du pixel détermine la plus petite caractéristique détectable du terrain. Selon elle, la résolution spatiale peut être subdivisée en 4 (Navulur, 2006). Une résolution faible est définie comme des pixels dont la distance d'échantillonnage au sol (GSD pour Ground Sample Distance) est de 30 m ou plus ; une résolution moyenne est une GSD comprise entre 2 et 30 m ; une haute résolution est une GSD de 0,5 à 2 m ; et une très haute résolution est une taille de pixel inférieur au 0,5 m GSD. **La résolution spectrale** concerne le nombre, l'emplacement dans le spectre électromagnétique et la largeur des bandes de longueur d'onde spécifiques ou bandes spectrales. Cette résolution diffère selon les capteurs et détermine en grande partie leur utilisation potentielle. L'ensemble des domaines du spectre électromagnétique allant des courtes longueurs d'onde (par exemple, l'ultraviolet) aux grandes longueurs d'onde (micro-ondes) est utilisé en télédétection (Elachi and Zyl, 2021). Le spectre optique réfléchi par le soleil couvre une gamme de longueurs d'onde allant d'environ 400 nm à environ 3000 nm. Il est divisé en 4 gammes de longueurs d'onde distinctes : Le visible (de 400 nm à 700 nm, la couleur bleue est approximativement 475 nm, le vert est approximativement 510 nm et le rouge est approximativement 650 nm), l'infrarouge proche (NIR) (700 nm à 1300 nm), infrarouge à ondes courtes 1 (SWIR-1) (1300 nm à 1900 nm), et infrarouge à ondes courtes 2 (SWIR-2) (1900 nm à 2500 nm). **La résolution temporelle** concerne le laps de temps entre deux images successives de la même zone. Elle est déterminée en premier lieu par la plateforme utilisée, et en second lieu par les conditions atmosphériques.

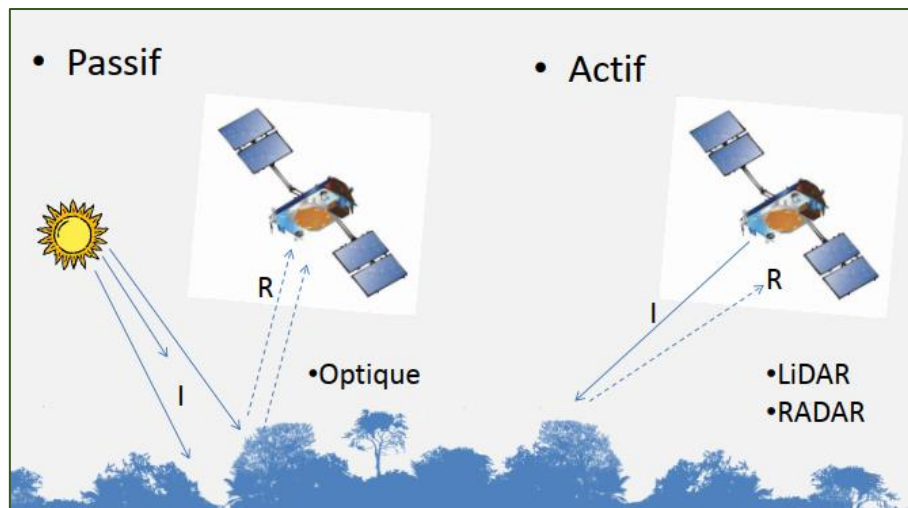


Figure 22 : Télédétection passive et active (O'Connor, 2014).

I est le rayonnement incident émis sur la surface de la terre et R la lumière réfléchiée mesurée par un capteur à distance.

Les premières applications de la télédétection dans le domaine de l'environnement en général se sont principalement axées sur l'automatisation de la cartographie du paysage ou des habitats permettant de décrire la biodiversité, suivi de la cartographie des espèces d'arbres, en utilisant des capteurs optiques à haute résolution (Stoms and Estes, 1993; Tuomisto et al., 1994). La télédétection permet d'avoir aussi une meilleure compréhension des processus physiques et biologiques et d'estimer certains paramètres caractéristiques des couverts végétaux, comme la quantité de biomasse, la surface foliaire, ou la fraction du rayonnement photosynthétique actif (Xue and Su, 2017). De nombreux chercheurs se sont penchés récemment sur l'étude des sites miniers grâce aux données de la télédétection (Chen et al., 2018; Li et al., 2020; Song et al., 2020; Werner et al., 2019). A titre d'exemples d'utilisation de la télédétection dans le contexte minier, on peut citer les applications de données issues d'une approche intégrée de la télédétection et du SIG, multi-échelle et multi-capteurs combinant des images de LiDAR et satellitaires pour cartographier des paysages d'anciennes mines d'étain dans le nord-ouest de l'Ibérie (Fonte et al., 2021). La télédétection permet un suivi à plusieurs échelles via les images satellites, et les images issues d'avions, drones, ou encore de caméras embarquées sur des tracteurs. **La télédétection par satellite** est l'un des outils les plus efficaces pour surveiller la terre à l'échelle locale, régionale et mondiale via des observations spatiales régulières, répétitives, et fidèles. Ces observations ayant un caractère non destructif traduisent la nature, l'état, la variation spatiale et temporelle des propriétés des objets observés. La télédétection terrestre par satellite contribue grandement à l'exploration des ressources minérales, à la surveillance des inondations et des sécheresses, de l'humidité des sols, de la végétation, de la

déforestation, des feux de forêt, du suivi de l'agriculture, et de la planification urbaine (Dubovik et al., 2021). Elle s'avère donc être un outil tout à fait approprié dans l'étude de la biosphère terrestre même si elle ne permet pas d'observer facilement et directement tous les paramètres relatifs à la végétation, comme la hauteur des arbres, la biomasse etc. Avec le développement rapide de la technologie des drones, la télédétection par drone a été largement utilisée dans la foresterie, l'agriculture et la surveillance de la végétation (Lu et al., 2020). **La télédétection par drone** présente de nombreux avantages, tels que l'acquisition instantanée d'informations, la haute résolution spatiale des images, la facilité d'utilisation, la grande maniabilité, l'absence d'interférence des nuages et le faible coût. Elle se fait grâce à des appareils embarqués. Les appareils photo numériques, les caméras hyperspectrales, multispectrales, et thermiques sont des capteurs couramment déployés par les drones. Les appareils photo numériques sont fréquemment utilisés dans la recherche sur le phénotypage de la végétation pour estimer la hauteur des plantes, la biomasse, le LAI, la couleur des feuilles etc. Les appareils photo numériques ont l'avantage d'être de faible coût, léger en poids, de fonctionnement pratique, et permettent un traitement des données simple. Ils présentent malheureusement des limites pour analyser avec précision les informations phénotypiques de la végétation pour déterminer les traits physiologiques (Ballesteros et al., 2014).

Les caméras hyperspectrales permettent d'imager des bandes spectrales étroites sur une plage spectrale continue, produisant les spectres de tous les pixels de l'objet. En revanche, les caméras multispectrales produisent des bandes discrètes et ont généralement une résolution spectrale plus faible (Colomina and Molina, 2014). L'imagerie spectrale permet d'acquérir les caractéristiques des végétations, telles que la teneur en eau des plantes, la concentration en N des feuilles, la teneur en chlorophylle, le LAI et d'autres paramètres physiques et chimiques. Les caméras thermiques utilisent des détecteurs infrarouges et une lentille d'imagerie optique pour recevoir l'énergie du rayonnement infrarouge dans le détecteur infrarouge de l'élément photosensible (Gonzalez-Dugo et al., 2013). Comme la g_s , l'E, et les caractéristiques photosynthétiques sont étroitement liés à la température des feuilles et de la canopée, la technologie d'imagerie thermique infrarouge peut être utilisée pour déterminer la réponse des plantes dans des différentes conditions hydriques (Zarco-Tejada et al., 2012). Il est possible de combiner plusieurs caméras sur un seul drone soit pour augmenter le champs de vision total en multipliant les points de vue d'un objet (Wierzbicki, 2018), soit pour visualiser le même objet mais dans des différentes parties du spectre (Berni et al., 2009).

1.3.3.2 Utilisation des indices de végétation

La végétation peut être étudiée à travers l'utilisation de paramètres dérivés des images de télédétection, le plus souvent par le calcul des indices de végétation à partir des mesures directes de réflectance. Des indices de végétation simples combinant les bandes visibles et NIR ont considérablement amélioré la sensibilité de la détection de la végétation verte. La végétation verte (végétation en bonne santé) présente des signatures spectrales uniques dans le spectre visible à SWIR (Gates et al., 1965) en absorbant généralement dans les longueurs d'onde rouge et bleue et les bandes d'absorption de l'eau atmosphérique dans la gamme SWIR et en réfléchissant dans les longueurs d'onde verte et la gamme du NIR (Figure 23).

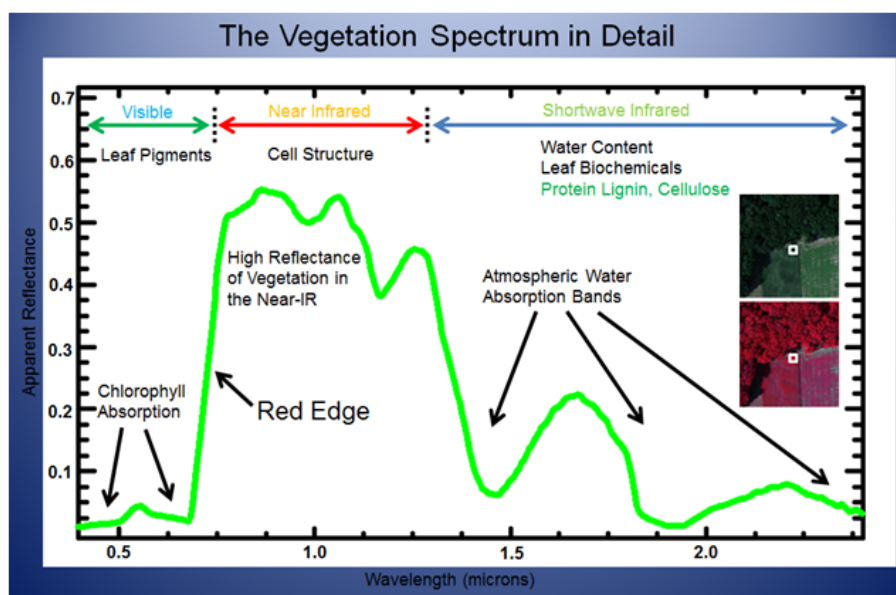


Figure 23 : Le spectre de réflectance de la végétation verte (Elowitz, 2014).

Les pigments foliaires, la teneur en eau, la teneur en N, et d'autres paramètres de croissance entraînent des variations dans le spectre de réflectance de la végétation et donc peuvent communiquer des informations significatives sur la santé des plantes via l'étude des différents indices de végétations. *Les pigments* sont essentiels au développement de la végétation, en raison de leurs implications dans les réactions photochimiques. Ils absorbent la lumière à différentes longueurs d'onde dans les régions de l'UV et du visible, en fonction de leurs propriétés chimiques. La chlorophylle est le pigment le plus important nécessaire à la photosynthèse et présente une absorption maximale de la lumière à environ 450 et 670 nm, ce qui caractérise les creux bleu et rouge et le pic vert dans la réflectance du spectre visible. En plus de la chlorophylle, la quantité d'anthocyanes, de caroténoïdes et de xanthophylles dans les feuilles régit l'absorption dans le spectre visible (Blackburn, 2007). *L'absorption par l'eau* des

feuilles est dominante dans la gamme spectrale NIR à SWIR. La réflectance des feuilles dans la région SWIR augmente en raison de la déshydratation des feuilles. Par conséquent, une augmentation de la réflectance dans cette gamme permet d'étudier le stress de la sécheresse des feuilles (Chandel et al., 2021). **La teneur totale en N** des feuilles est liée aux taux d'assimilation du CO₂ et à la teneur en chlorophylle. Il joue donc un rôle clé dans la photosynthèse. Normalement, les plantes ayant un apport adéquat en N ont une couleur vert foncé en raison de concentrations élevées de chlorophylle, ce qui est associé à une forte croissance des plantes. À l'inverse, une carence en N entraîne une réduction de la croissance des plantes et des concentrations en chlorophylle et se caractérise souvent par le jaunissement (chlorose) des feuilles. Par conséquent, la carence en N réduit souvent l'absorption dans la partie visible et donne une réflectance élevée des feuilles dans les bandes vertes (Yoder and Pettigrew-Crosby, 1995). **La biomasse et le LAI** (rapport entre la somme de la surface foliaire et l'unité de surface au sol) sont des bons indicateurs de la croissance. Au niveau de la canopée, ils ont des effets relativement importants sur la réflectance NIR que sur le visible. Une quantité élevée de biomasse et un LAI important produisent souvent une réflectance plus élevée dans les bandes NIR et SWIR, c'est pour cette raison, que ces bandes sont souvent utilisées pour la modélisation de la biomasse végétale et du LAI (Jégo et al., 2012). L'estimation de la biomasse et du LAI à partir des données de télédétection par drone est de plus en plus rapportée (Hunt et al., 2008), par exemple en agriculture (Yao et al., 2017), dans les écosystèmes de mangrove (Tian et al., 2017) et de forêt (Lin et al., 2021). Bien que les drones soient déjà utilisés pour la surveillance des décharges (Rauhala et al., 2017; Shahmoradi et al., 2020), à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'utilisation des drones pour estimer le LAI dans les terroirs sous phytomanagement.

Les indices de végétation sont dérivés de combinaisons de bandes électromagnétiques qui sont corrélées à des caractéristiques spécifiques de la végétation. Ils sont principalement basés sur le comportement spectral de la végétation dans les canaux du Rouge (R) et du NIR (Xue and Su, 2017). Certaines études suggèrent également l'utilité des bandes SWIR (Thenkabail et al., 2013). Les indices de végétation peuvent être classés en trois classes selon qu'ils prennent ou non en compte les facteurs externes aux couverts végétaux (Daughtry et al., 2000). Pour les indices prenant en compte les effets des sols, nous avons l'exemple d'indice de végétation ajusté pour le sol (SAVI pour Soil-Adjusted Vegetation Index) (Huete, 1988) et ses différents dérivés tels que le TSAVI (indice transformé de végétation ajusté pour le sol) (Baret et al., 1989) ou le MSAVI (indice modifié de végétation ajusté pour le sol) (Qi et al., 1994). Le

SAVI a un paramètre d'ajustement, noté L, qui caractérise le sol et son taux de recouvrement par la végétation. Cet ajustement permet une correction optimale de la rétrodiffusion du sol à travers le couvert végétal. Le paramètre L prend la valeur de 0,25 pour une forte densité, 0,5 pour une densité intermédiaire et 1 pour une très faible densité de végétation.

$$SAVI = \frac{(NIR - R) \times (1 + L)}{NIR + R + L}$$

Concernant les indices prenant en compte les effets de l'atmosphère, on retrouve entre autre l'indice de végétation résistant à l'atmosphère (ARVI pour Atmospherically Resistant Vegetation Index) (Kaufman and Tanre, 1992). L'indice ARVI réduit les gaz et aérosols présents dans l'atmosphère par une correction basée sur la différence entre les bandes spectrales Bleu (B) et R, car la diffusion est davantage sélective vis-à-vis des courtes longueurs d'onde B que vis-à-vis des grandes R. Le facteur d'autocorrection atmosphérique δ dépend du type d'aérosols présents et est calculé à partir des réflectances intrinsèques de l'atmosphère dans les bandes B et R.

$$ARVI = \frac{NIR - [R - \delta (B - R)]}{NIR + [R - \delta (B - R)]}$$

Les indices intrinsèques de la végétation sans correction sont les indices de base. Il y a par exemple :

- L'indice de végétation par quotient (RVI pour Ratio Vegetation Index) (Jordan, 1969; Krieglner et al., 1969) est utilisé pour les estimations et le suivi de la biomasse verte, en particulier lorsque la couverture végétale est très dense, car cet indice est très sensible à la végétation et présente une bonne corrélation avec la biomasse végétale. Toutefois, lorsque la couverture végétale est clairsemée (moins de 50% de couverture), RVI est sensible aux effets atmosphériques et la contribution spectrale des sols, et sa représentation de la biomasse est faible.

$$RVI = \frac{NIR}{R}$$

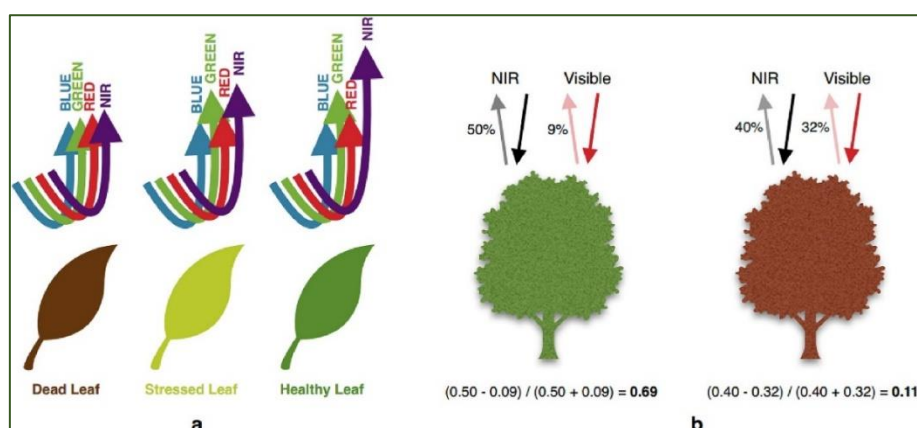
- L'indice différentiel de végétation (DVI pour Difference Vegetation Index) (Bacour et al., 2006) renseigne sur une couverture suffisante ou non du sol par la végétation, et peut être appliqué à la surveillance de l'environnement écologique de la végétation. Cependant, il est extrêmement sensible aux changements de fond du sol.

$$DVI = NIR - R$$

- L'indice de végétation de différence normalisée (NDVI pour Normalized Difference Vegetation Index) (Tucker, 1979) est l'un des indices les plus utilisés et robustes pour estimer le stress biotique (carence en chlorophylle) et le stress abiotique (sécheresse hydrique) des végétaux (Croft et al., 2017). La normalisation par la somme des deux bandes permet de réduire les effets d'éclairement.

$$NDVI = \frac{NIR - R}{NIR + R}$$

Les valeurs NDVI vont de 0,2 à 0,8 pour la végétation et sont sans unité. Des valeurs NDVI élevées indiquent une végétation verte, dense et en saine, et des valeurs NDVI faibles indiquent une végétation clairsemée et stressée (Drisya et al., 2018). La végétation spongieuse et saine reflète beaucoup de lumière dans le spectre NIR, ce qui contraste fortement avec la plupart des objets non végétaux. En revanche, la végétation déshydratée et malsaine reflète moins de lumière dans le NIR, mais la même quantité dans le domaine visible (Figure 24).



1.3.4 Cas particulier des sites liés à l'industrie minière

1.3.4.1 Généralités

L'exploitation minière des métaux et des minéraux (Tableau 5) représente un large éventail d'activités dont dépendent de nombreuses économies nationales. Depuis les années 1970, l'extraction de métaux a augmenté de plus de 75%. Cette importante augmentation des activités extractives a un fort impact sur l'environnement. Les principales répercussions environnementales des installations de gestion des résidus et des terrils comprennent les incidences liées à l'emplacement du site et à l'occupation des sols correspondante, ainsi que les éventuelles émissions d'effluents et de poussière durant l'exploitation ou la phase d'entretien après fermeture.

Tableau 5 : Principaux métaux et minéraux industriels produits par l'industrie minière (Cooke et Johnson, 2002).

Type	Principaux minéraux
Minéraux énergétiques	Uranium
Métaux et minéraux précieux	Or, argent, groupe du platine, diamants
Métaux ferreux (sidérurgie)	Fer, manganèse, nickel, chrome, cobalt, molybdène
Principaux métaux non ferreux	Aluminium, plomb, zinc, cuivre, étain
Métaux spéciaux	Titane (Ti) , cadmium
Minéraux industriels	Amiante, gypse, phosphate, potasse, kaolin, sel, perlite, vermiculite, spath fluor, barytine, graphite, soufre

1.3.4.2 Production du dioxyde de titane



Le Ti est l'un des métaux spéciaux produit de plus en plus de nos jours dont les principales propriétés sont regroupées dans le Tableau 6. Appelé le « métal de l'ère spatiale » en raison de son utilisation très répandue dans les compagnies aériennes et la défense pour sa légèreté et de sa durabilité, le Ti a une densité unique, résiste à la corrosion et a des avantages en termes de force relative par rapport aux matériaux concurrents tels que l'Al, les aciers et les superalliages. Le Ti a trouvé une niche très importante dans de nombreuses industries (Donachie, 2000). En plus de son utilisation dans la fabrication des moteurs d'avions ou des turbines à gaz, le Ti est utilisé comme matière première pour la fabrication d'implants et de prothèses chirurgicales et dentaires, en raison de sa biocompatibilité, capacité à être accepté par le tissu osseux (Viteri and Fuentes, 2013). Le corps pur de Ti, qui est un métal léger, résistant à la corrosion, d'aspect blanc métallique, est principalement utilisé dans les alliages légers et

résistants, et son oxyde est utilisé comme pigment blanc. Ces caractéristiques en ont fait le pigment le plus largement utilisé dans des industries de la peinture, des cosmétiques, du papier, de la pharmacie et même de l'alimentation (TDMA, 2013). Le Ti ayant des propriétés chimiques pour absorber et réfléchir la lumière ultraviolette et visible, il est utilisé comme photo-catalyseur sous la forme de dioxyde de titane (TiO_2). La majeure partie de la production minière de Ti (environ 94%) est destinée à la production de TiO_2 , le pigment blanc le plus utilisé. Les 6% restants de la production sont utilisés pour fabriquer du Ti métallique. On retrouve du Ti dans plusieurs minéraux tels que le rutile (TiO_2), l'ilménite ($\text{FeO}\cdot\text{TiO}_2$), le pérovskite (CaTiO_3), l'arizonite ($\text{Fe}_2\text{Ti}_3\text{O}_9$), ou le sphène (CaTiSiO_5). Mais seuls le rutile et l'ilménite (Tableau 7) composés respectivement de plus de 90% et 60% de TiO_2 (Duyvesteyn et al., 2002), sont utilisés industriellement pour produire du Ti. Provenant de l'érosion de roches, ils s'accumulent souvent dans des placers, sous forme de sables le long des côtes. Les principaux pays producteurs d'ilménite sont l'Afrique du Sud, la Chine, l'Australie, la Mozambique et le Canada. Cependant, le rutile est produit principalement par l'Australie, la Sierra-Leone, les États-Unis, l'Ukraine et le Kenya (Figure 25).

Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques générales du titane (Ti).

<i>Numéro atomique</i>	22
<i>Dureté</i>	6
<i>Masse atomique</i>	47,867 g/mol
<i>Masse volumique</i>	4,51 g/cm ³
<i>Groupe, Période, Bloc</i>	4, 4, d
<i>Famille d'éléments</i>	Métal de transition
<i>Structure électronique</i>	3d ² 4s ²
<i>Température de fusion</i>	1668°C
<i>Température d'ébullition</i>	3287°C

Tableau 7 : Propriétés d'ilménite et de rutile (Whitehead, J. 1983).

Ilménite (FeTiO₃)	
% TiO₂ : 52,6	
Couleur : Noir	
Dureté : 5 - 6	
Densité : 4,5 - 5,0	
Rutile (TiO₂)	
% TiO₂ : 95	
Couleur : Brun, rouge, jaunâtre ou noir	
Dureté : 6 - 6,5	
Densité : 4,23 - 5,5	

Les principaux producteurs de TiO₂ dans le monde sont regroupés au sein du groupement TDMA (Titanium Dioxide Manufacturers Association). En Europe, la production est assurée dans 16 usines, dont une seule en France. Appartenant actuellement à TRONOX premier producteur mondial de TiO₂, la seule usine française est située à Thann (68), et a une capacité de production de 32000 t/an selon le procédé sulfurique qui sera détaillé ci-dessous. L'usine de Thann fut, en 1922, la première usine au monde productrice de TiO₂.

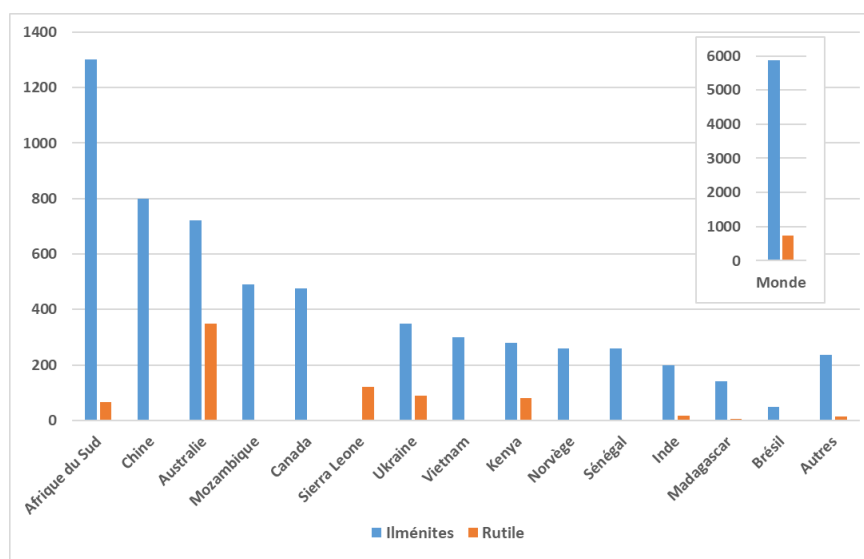


Figure 25 : Volume de production de minerais de Ti par pays et dans le monde en 2016, en milliers de tonnes d'équivalent TiO₂ (Statista Research Department, 2018).

La production de TiO_2 se fait à l'aide deux oxydants puissants à savoir le chlorure (environ 60 % de la production totale de TiO_2) ou le sulfate (environ 40 %) (Figure 26). Le procédé au chlorure présente certains avantages par rapport au procédé traditionnel au sulfate en terme de coût et de gestion des déchets (Braun et al., 1992). Le procédé au sulfate donne des produits de qualité inférieure pour la plupart des applications et de grandes quantités de déchets de FeSO_4 . Le choix de l'oxydant dépend de la matière première et aussi de la maîtrise des procédés par les sociétés productrices de TiO_2 . L'ilménite contenant environ 60 % de TiO_2 et le rutile sont utilisés par le procédé au chlorure. L'ilménite constitué de moins de 45 % de TiO_2 , peut être utilisée directement par le procédé sulfurique, ou subir des traitements thermiques et chimiques pour augmenter sa teneur en TiO_2 ce qui pourrait permettre de l'utiliser dans le procédé au chlorure, ou limiter les consommations d'acide et les émissions dans le procédé sulfurique.

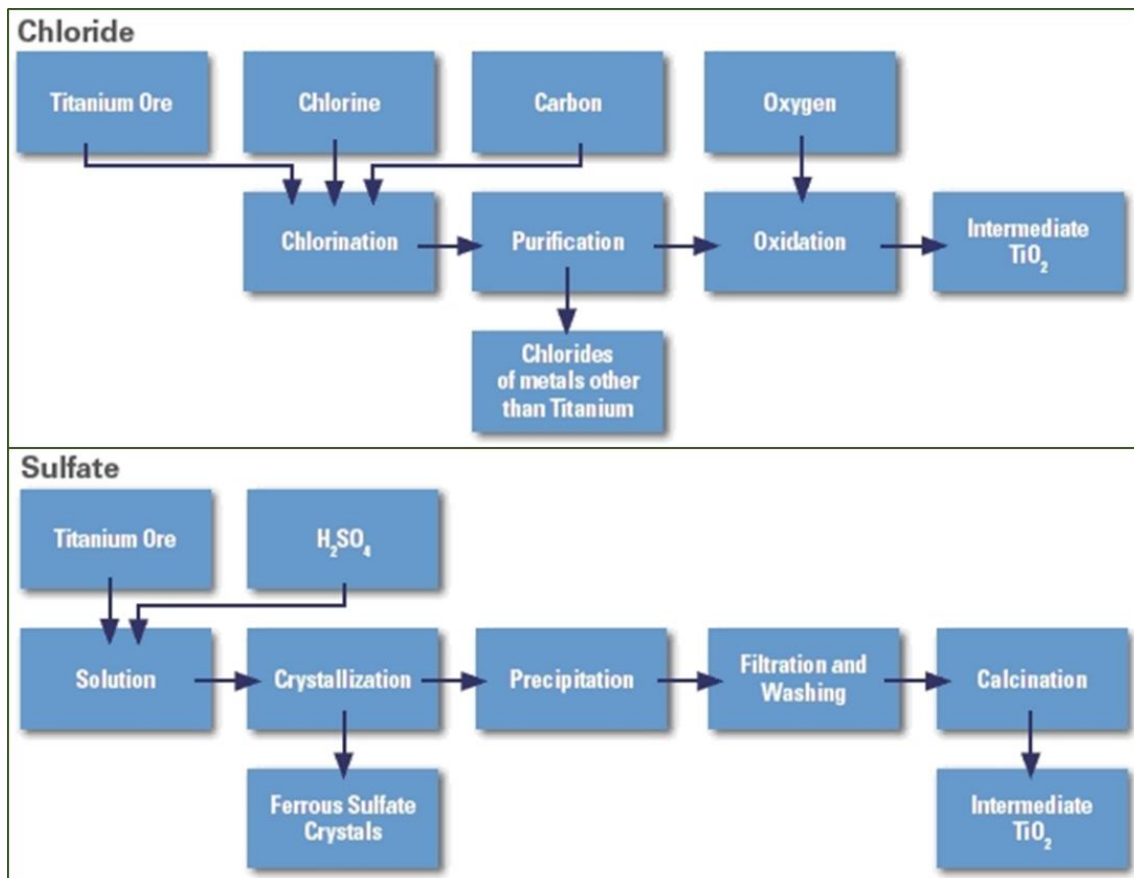


Figure 26 : Les deux procédés de production de TiO_2 (Guichon, 2022).

1.3.4.3 Gypse rouge issue de la production de TiO_2

Dans toute activité minière, les étapes types du processus comprennent l'extraction, puis le traitement du minerai, l'expédition des produits et en fin la gestion des sous-produits. Lors des procédés de la production de TiO_2 , les usines recyclent certains sous-produits, comme l'ammoniac ou l'acide chlorhydrique. Cependant, certains ne sont actuellement pas recyclés suffisamment, comme un matériau appelé communément le « gypse rouge ». Le gypse rouge est l'un de sous-produits finaux du processus industriel de la production du TiO_2 , où un flux liquide faiblement acide, composé principalement de 1,36 % de H_2SO_4 et de 0,28 % de FeSO_4 , est traité dans une installation de neutralisation à l'aide de chaux ou de calcaire. Pour chaque tonne de TiO_2 produite, 5 à 7 tonnes de gypse rouge sont générées (Gázquez et al., 2009). Le gypse rouge reçoit son nom en raison de la couleur qu'il présente, qui est due à la présence d'oxydes de Fe provenant de l'ilménite (FeTiO_3). Il est notamment formé par un mélange de gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), de calcite (CaCO_3), d'hydroxyde ferrique ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), de rutile et de quartz (Zhang et al., 2019). Les gypses rouges contiennent aussi des ETM à des teneurs relativement élevés (Tableau 8). La composition exacte du gypse rouge varie en fonction de la matière première, de son origine géographique, mais aussi des procédés industriels utilisés. L'élimination finale du gypse rouge se fait généralement par la mise en décharge des résidus dans des bassins dédiés pour former un terril qui donne un paysage particulier (Figure 27 et Figure 28), souvent isolé par une membrane ou des digues de protection.



Figure 27 : Paysage formé de gypse rouge sur le terril d'Ochsenfeld issue de l'usine TRONOX Thann, France (IGN Géoportail, 2018).

Tableau 8 : Composition du gypse rouge (Peacock and Rimmer, 2000).

ETM	Teneur en %	ETM	Teneur en %	ETM	Teneur (en mg/kg)	ETM	Teneur (en mg/kg)
CaSO₄.H₂O	58,5-59,3	Mg	0,5-0,6	Cr	500-800	Co	20-30
Fe₂O₃.H₂O	32,9-36,6	Mn	0,2-0,5	Zn	200-400	Ba	1-3
Ti	1-1,3	Si	0,3-0,5	Sr	100-300	Pb	1-2
Al	0,1-0,8	Cl	0,02-0,2	Ni	50-60		



Figure 28 : Terril de gypse rouge issue de l'usine d'extraction de Ti basée à Nguluku Maumba, Kwale Kenya (Business Daily, 2016).

Il existe peu d'études sur la valorisation potentielle de ces volumes considérables de gypse rouge. Il est possible d'utiliser le gypse rouge comme liant pour remplacer certaines parties du ciment, dans la fabrication de pavés (Hughes et al., 2010), ou dans la fabrication de matériaux à faible résistance pour certaines applications telles que la couverture de tranchées ou le remplissage de mines (Claisse et al., 2008; Rosli et al., 2020). Il peut aussi remplacer le gypse naturel ajouté entre 3 et 5% au clinker, un constituant de ciment utilisé comme retardateur de prise pour les ciments commerciaux (Gázquez et al., 2012). Le gypse rouge peut être aussi utilisé comme inhibiteur de l'érosion des sols (Hodson et al., 2001) pour l'immobilisation des ETM dans les sols (Fauziah et al., 1996). Cependant, toutes ces filières ne constituent qu'un potentiel limité de valorisation du gypse rouge. En attendant de développer des filières de valorisation adoptées pour les millions de tonnes des gypses rouges générés chaque année, la végétation de ces terrils de gypse rouge est très encouragée, car elle peut contrôler efficacement l'érosion par le vent et l'eau des résidus et peut améliorer le paysage (Mendez and Maier, 2008).

Il est démontré que certaines espèces d'arbres peuvent se développer sur ces terrils en stabilisant les ETM au niveau des racines sans un grand transfert dans les parties aériennes (*Platanus orientalis*, *Ulmus pumila*, *Ostrya carpinifolia*, *Acer buergerianum*), par contre les espèces du genre *Salix*, *Populus*, *Betula* et *Quercus* accumulent les ETM (Cd, Zn et/ou Mn) dans les parties aériennes (Ciadamidaro et al., 2019).

Ces sites riches en ETM sont appelés généralement des sites métallifères. Dans ces substrats, rares sont les espèces végétales qui peuvent se développer, en raison des concentrations toxiques de certains éléments et du manque d'autres nutriments essentiels (N, P et K). Parmi ces sites, il y a ceux qui sont d'origines naturelles, à l'exemple des sites issus de l'altération de minéraux naturellement riches en ETM (Ni, Fe, Cr, etc.) qui portent une flore spécifique adaptée aux fortes teneurs des ETM. Dans le cas des sites métallifères d'origine anthropique, il y a par exemple les boues rouges issues de l'extraction d'Al sur lesquels plusieurs études concernant la revégétalisation ont été réalisées (Finngean et al., 2018; Kaur et al., 2016; Zhu et al., 2015) et qui pourront inspirer la revégétalisation des gypses rouges.

1.3.4.4 Boue rouge issue de la production d'Al

La boue rouge est un sous-produit issue de la digestion des minerais de bauxite par le procédé Bayer reposant sur une attaque alcaline à chaud et à forte pression pour la production d'alumine (Al_2O_3) (Jones and Haynes, 2011). Elle est caractérisée par un pH alcalin, une salinité et une conductivité élevée, une texture compacte ainsi qu'une très faible teneur en matière organique et en éléments nutritifs disponibles (N, P, K). D'autres ETM tels que le Mn, le Zn ou le Cu nécessaires à la croissance des plantes, ne sont majoritairement pas disponibles, car présents sous forme résiduelle liés aux oxydes de Fe et d'Al. Certains ETM (Cr, Fe, Na, Ni et V) dépassaient les plages typiques des sols non contaminés, et d'autres (Al, As, Cr, Hg et V) présentaient des fractions disponibles pour les plantes à des niveaux excessifs (Di Carlo et al., 2019). La boue rouge est constituée de composants provenant des résidus de bauxite ainsi que d'autres matières supplémentaires ajoutées pendant le procédé de production. Le Tableau 9 représente la composition générale des boues rouges. Cependant, la composition réelle de la boue rouge dépend de l'emplacement de la mine, du type de bauxite et des différents paramètres du procédé Bayer. Une quantité limitée de la boue rouge est actuellement utilisée dans diverses applications, notamment la récupération de composants, la production de matériaux de construction, ou l'utilisation comme matériau de remplissage. Cependant la grande quantité des

boues rouges sont stockées dans des sites dédiés qui suscitent des inquiétudes dans le monde à cause des ruptures de digues et des déversements récurrents (Khairul et al., 2019), où la présence de végétation peut servir à réguler l'humidité du substrat par les phénomènes d'évapotranspiration. L'une des catastrophes la plus connues et la mieux documentée liée à la boue rouge s'est produite en Hongrie le 4 octobre 2010 (Figure 29), lorsque le mur du barrage de la raffinerie d'Ajka s'est effondré, entraînant l'inondation de la zone environnante (plusieurs villages) par la boue rouge estimée à environ un million de mètres cubes (Kossoff et al., 2014). En France, le site de Mange-Garri situé à la commune de Bouc-Bel-Air (Figure 30) est dédié au stockage des boues rouges issues de l'usine Alteo de Gardanne, qui est la toute première usine au monde où l'alumine a été fabriquée selon le procédé industriel Bayer.

Tableau 9 : Composition typique de la boue rouge (Khairul et al., 2019).

Composition	Teneur en %	Composition	Teneur (en mg/kg)	Composition	Teneur (en mg/kg)
Fe₂O₃	30-60	U	50-60	Mn	85
Al₂O₃	10-20	Ga	60-80	Y	60-150
SiO₂	3-50	V	730	Ni	31
Na₂O	2-10	Zr	1230	Zn	20
CaO	2-8	Sc	60-120	Lanthanides	0.1% à 1%
TiO₂	Trace-25	Cr	497	Th	20-30

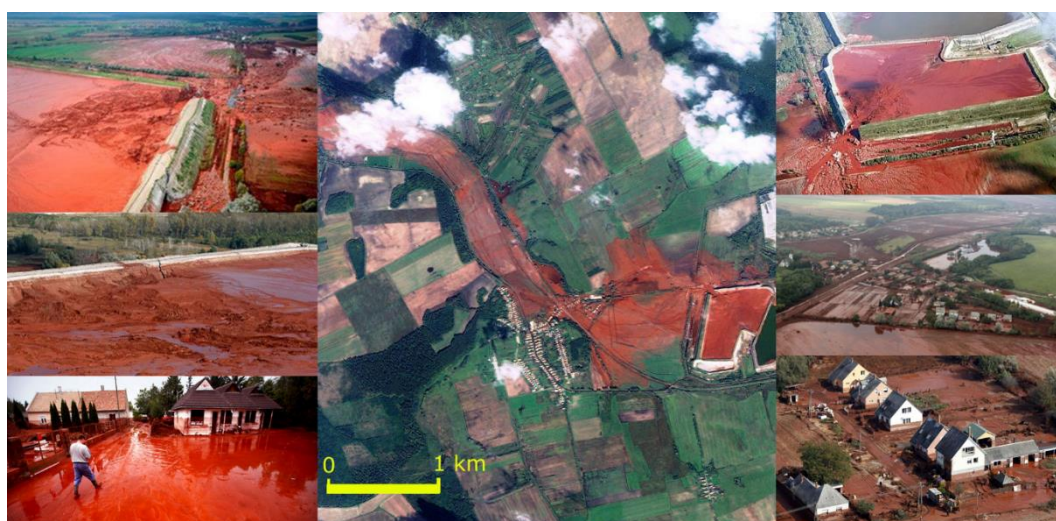


Figure 29 : Rupture de digues du bassin contenant la boue rouge causant l'inondation de la zone environnante à Ajka en Hongrie.



Figure 30 : Site de Mange-Garri de Bouc-Bel-Air dédié au stockage de boues rouges issues de l'usine Alteo de Gardanne.

Comme pour le gypse rouge, les amendements organique et biologique peuvent favoriser les conditions agronomiques et microbiennes de la boue rouge et améliorer la croissance des plantes, pour un recouvrement par végétalisation (Di Carlo et al., 2019). Dans une étude réalisée sur un terri de boue rouge résiduelle de bauxite répartis sur une superficie de 104 ha, situé à Limerick dans le sud-ouest de l'Irlande, (Courtney et al., 2014) avaient testé l'effet des amendements gypse et compost sur l'amélioration des propriétés de la boue rouge. Ils ont confirmé que les amendements améliorent les propriétés physico-chimiques et microbiologique (Figure 31) de la boue rouge. Le résidu non amendé (site A) avait le pH, la CE, le Na, et la densité apparente les plus élevés, et en revanche, la matière organique et les activités enzymatiques les plus faibles des quatre sites étudiés, avec des niveaux non détectables de P et N. La procédure d'amendement, quelle que soit la durée de celle-ci (sites B, C et D), a permis d'améliorer les propriétés du sol.

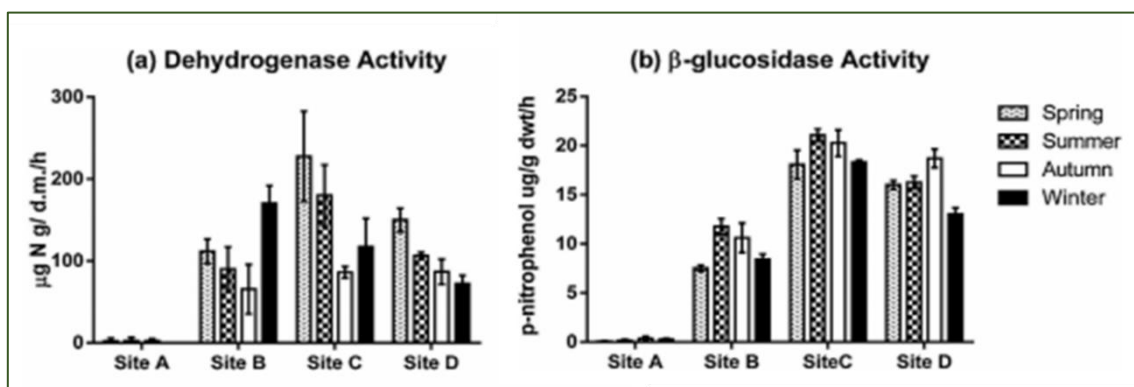


Figure 31 : Activités enzymatiques microbiennes du sol: (a) déshydrogénase et (b) beta-glucosidase, sur 4 quatre sites pour chaque saison. Site A (non réhabilité), site B (1 an), site C (10 ans) et site D (12 ans).

En un an, les sites amendés et végétalisés présentait des propriétés physico-chimiques améliorées et une stabilité accrue des agrégats. L'amélioration de ces propriétés au cours des années suivantes, l'accumulation de C et N, et l'augmentation significative des activités enzymatiques confirment la pérennité des procédés de phytomanagement (Courtney et al., 2013). Cette même équipe avait rapporté dans une autre étude (Courtney et al., 2009), que les boues rouges amendées avec succès favorisent la diversification d'espèces végétales qui vont naturellement coloniser le site. Un total de 47 espèces a été recensé sur le site parmi lesquels des espèces ligneuses des genres *Betula* et *Salix*.

La végétalisation de bassin de résidus de bauxite à Kirkvine en Jamaïque par exemple a été aussi un énorme succès (Evans, 2016). Le résidu de bauxite nu d'origine s'est transformé en une zone verte raisonnablement bien couverte après 3 ans et en une zone verte luxuriante après 5 ans (Figure 32).



Figure 32 : Évolution de la végétalisation de bassin de résidus de bauxite à Kirkvine en Jamaïque (Evans, 2016)

La procédure a été la suivante : d'abord, du fumier de volaille a été utilisé pour amender les sols, et ensuite, l'ensemencement a été effectué en utilisant un mélange de graines : *Cynodon plectostachyus*, *C. dactylon*, *Brachiaria decumbens*, *Leucaena leucocephala*, *Ricinus communis*, *Haematoxylum campechianum*, et *Lablab purpureus*. La végétalisation du site a permis de restaurer la biodiversité. L'inventaire floristique en 2011 a permis d'identifier 56 espèces végétales dont *L. leucocephala* était l'espèce végétale la plus abondante avec certains qui mesuraient plus de 7 m de haut. Une autre enquête menée en 2015 a permis d'identifier : 26 espèces d'oiseaux, 2 espèces de lézards, 2 espèces de grenouilles, 35 espèces de papillons de jour, 12 espèces de papillons de nuit, 3 espèces d'araignées, 2 espèces d'escargots, et 2 espèces de mammifères.

Objectifs

2 Objectifs du travail de thèse

Au travers de la synthèse bibliographique, nous avons montré que les végétaux peuvent avoir un effet sur les ETM en impactant leur mobilisation et leur transfert des racines vers les feuilles. Ils peuvent également impacter les flux d'eau au travers le phénomène d'évapotranspiration. Cependant, peu d'études ont été réalisées concernant la revégétalisation des gypses rouges pour limiter leur impact. Bien que les plantes jouent un rôle prépondérant, des bactéries au niveau des rhizosphères peuvent aussi contribuer au transfert des ETM en modifiant leurs formes chimiques. Sur les sites et sols contaminés par des ETM en général et les terrils de gypse rouge en particulier, les problématiques restent la croissance des végétaux et la gestion des flux d'eau.

De ce fait, l'objectif applicatif de ce projet de thèse est de proposer des pistes pour la revitalisation du terril de sous-produits industriels issue de l'usine TRONOX France, par la mise en œuvre d'une démarche de revégétalisation et biodynamisation, qui favorisera la production d'un gisement de biomasse potentiellement valorisable, tout en réduisant les nuisances. L'installation d'une végétation durable qui pourrait également favoriser la diminution de la quantité d'eau à traiter grâce au mécanisme de l'évapotranspiration. L'objectif scientifique général est donc la recherche d'une combinaison optimale « substrat/amendement/espèce végétale » pour favoriser les conditions d'une meilleure revégétalisation.

Les enjeux du site et les objectifs spécifiques de cette thèse sont les suivants :

1. Favoriser la stabilisation des ETM du sol par le couvert végétal (Article 1).

La question scientifique qui se pose pour répondre à cet enjeu est de déterminer lequel des amendements organique (le digestat) ou biologique (l'inoculum bactérien) donnerait une combinaison optimale « substrat/amendement » ? Nous faisons l'hypothèse qu'une combinaison optimale pourrait améliorer la production végétale et augmenter la capacité de stabilisation des ETM, ce qui réduira les impacts environnementaux.

2. Accroître le potentiel d'évapotranspiration du site (Article 2).

Pour ce deuxième enjeu, le but est d'évaluer la capacité de transpiration des différentes espèces d'arbres capables de pousser sur le substrat, et d'étudier une relation potentielle entre le flux de transpiration et la translocation des ETM. Un panel de 16 arbres plantés sur le site en 2014 a servi de parcelle pilote, doublé d'une expérimentation en mésocosme au laboratoire. Des techniques innovantes comme la télédétection portée par les drones ont été utilisées pour estimer la surface foliaire et déduire la transpiration à l'échelle d'individu. L'hypothèse que nous posons ici est que la sélection des espèces d'arbres pour leurs teneurs foliaires en Mn (et / ou d'autres ETM) ne serait pas antagoniste à la sélection des espèces ayant un taux de transpiration élevée.

3. Comprendre les mécanismes de transfert de Mn dans les biomasses aériennes (Article 3).

Pour finir, nous avons étudié la capacité des bactéries isolées sur le site d'Ochsenfeld à solubiliser de Mn, le rendant ainsi biodisponible pour les plantes. Le Mn biodisponible pourrait s'accumuler dans la partie aérienne donnant des biomasses enrichies et valorisables. Les caractéristiques fonctionnelles et génomiques de la souche bactérienne *Pseudomonas sp.*, ayant la plus grande capacité, ont été déterminées. L'hypothèse de cette partie est que les bactéries présentes sur les bassins de stockage participeraient à la solubilisation du Mn et donc à son absorption par la végétation, par des mécanismes moléculaires.

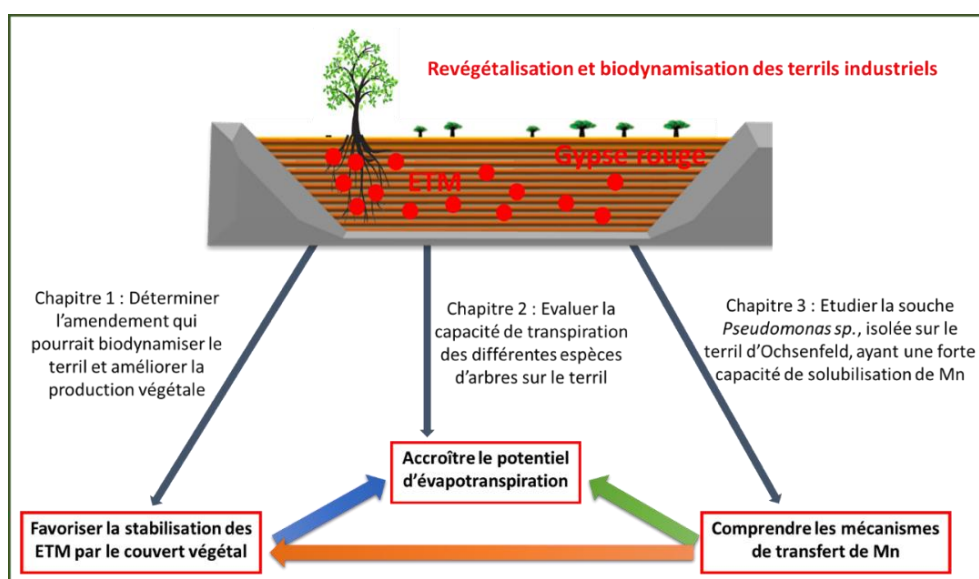


Figure 33 : Schéma conceptuel représentant les trois objectifs de la thèse.

Matériels & Méthodes

3 Matériels et Méthodes

3.1 Site d'études

L'usine Tronox à laquelle appartient le site d'étude est la première usine au monde à produire du TiO_2 dont la fabrication a démarré en 1922. Le procédé à l'origine de la production de gypse rouge utilisé comme substrat a été présenté dans la section 1.3.4.3 Gypse rouge.

Les expérimentations de terrain se sont déroulées sur le site de l'Ochsenfeld (Figure 34) (lat. $47^\circ 47' 47.6124''$ N - long. $7^\circ 8' 18.6498''$ E) situé à Thann dans le département du Haut-Rhin (68) en région Grand Est. Le site de l'Ochsenfeld s'étend sur une superficie de 80 ha, et se trouve à 3 km du complexe industriel TRONOX France. Il est référencé 68.0019 sur BASOL, ALS6800222 sur BASIAS, et SSP3766324 sur la nouvelle base de données CASIAS. L'exploitation du site de l'Ochsenfeld a commencé dans les années 1930 avec le stockage d'électrolyse de chlorure alcalin. C'est le terri l historique qui se trouve en profondeur sur le site. A partir de 1990, le site commence à accueillir des produits résiduels (notamment gypse rouge) issus de la production de TiO_2 , pour recouvrir les résidus anciens. En 2001, à la suite d'une forte pollution aux Hg, SO_x et Cl^- détectées dans la nappe phréatique environnante, l'exploitant a été contraint de construire des parois étanches autour du terri l. La plus longue paroi moulée en ciment imperméable d'Europe (3,5 km de long) a donc été construite en 2004 pour protéger les aquifères de la nappe phréatique des résidus du terri l.

Le substrat utilisé pour les travaux réalisés en mésocosme provient de la parcelle D1 (Figure 34) qui est une zone de près de 3 ha, inactive depuis une dizaine d'années et d'une hauteur de plus de 20 mètres. Une partie des expériences de terrain s'est aussi déroulée sur cette même parcelle D1. En revanche, l'autre partie s'appuie sur un dispositif expérimental d'une surface d'environ 1 ha sur laquelle 18 essences ligneuses ont été plantées en novembre 2014 dans le cadre du projet PROLIPHYT géré par le laboratoire Chrono-environnement (Figure 34). Le substrat « gypse rouge » présente un caractère limoneux alcalin et contient des faibles quantités en matière organique (Tableau 10). Il contient principalement du gypse (CaSO_4), du Fe, du Mn, du S et du Cr. Le Fe et le Mn sont présents sous forme d'oxydes. Les nutriments (N, P, et K) ont des teneurs très faibles donc limitantes pour la végétation (Tableau 11).



Figure 34 : Vue aérienne du site d'Ochsenfeld, la parcelle D1 en jaune et la parcelle PROLIPHYT en bleu (IGN Géoportail, 2018).

Tableau 10 : Distribution granulométrique et caractéristiques physico-chimiques du gypse rouge (n=6). Corg : carbone organique ; M O : matière organique ; Ntot : azote total ; C/ N : rapport carbone sur azote ; CEC : capacité d'échange cationique.

Argile %	Limon fin %	Limon grossier %	Sable fin %	Sable grossier %	pH	CaCO ₃ %	P assimilable g/ kg
8,18 ± 0,84	46,38 ± 1,94	25,83 ± 3,95	14,75 ± 1,16	4,85 ± 3,95	7,9 ± 0,12	8,98 ± 1,63	0,01 ± 0
Corg g/ kg	M O g/ kg	N tot g/ kg	C/ N	CEC meq/ kg	K ₂ O g/ kg	MgO g/ kg	CaO g/ kg
7,15 ± 2,29	12,38 ± 3,98	0,37 ± 0,03	19,3 ± 4,46	51 ± 5,42	0,01 ± 0	0,76 ± 0,59	87,2 ± 1,41

Tableau 11 : Teneurs en ETM total et extractible au CaCl₂ du gypse rouge (mg/kg MS) (n=5) (Assad et al., 2017). Les données inférieures à la limite de quantification sont indiquées par la mention < LQ et les données non déterminées par ND.

	Al	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K
Total	5384 ± 64	125524 ± 2020	< LQ	174 ± 2	49,9 ± 00,3	45799 ± 655	584 ± 10
Fraction extractible au CaCl ₂	< LQ	ND	< LQ	1,09 ± 0,02	< LQ	0,25 ± 0,04	112,8 ± 3,4
	Mg	Mn	Na	P	S	Ti	Zn
Total	977 ± 9	2955 ± 33	48,7 ± 0,7	103 ± 3	90869 ± 858	6245 ± 90	99,5 ± 0,8
Fraction extractible au CaCl ₂	7,03 ± 0,12	< LQ	10	< LQ	3714 ± 122	ND	< LQ

3.2 Matériel végétal

Le travail de la thèse a été réalisé sur 16 des 18 espèces ligneuses du dispositif PROLIPHYT ainsi que sur *Betula pendula*, l'une des espèces pionnières du site d'Ochsenfeld utilisée dans plusieurs expériences. Le dispositif PROLIPHYT a consisté en l'apport d'une couche de 30 cm de remblai sur le terril nu, puis en l'implantation de 8 lots comprenant 18 essences différentes (Figure 35 et Tableau 12), avec un total de 264 plantes/ espèce. Deux des 18 espèces du dispositif PROLIPHYT ayant présenté un développement limité sur le site (*Quercus rhysophylla* et *Q. rubra*), n'ont pas été intégrées à ces travaux. L'ensemble des arbres a été fourni par la pépinière Soupe (Chatillon sur Chalaronne, France). Le dispositif expérimental de chaque expérience est détaillé dans le matériel et méthodes des différents chapitres.

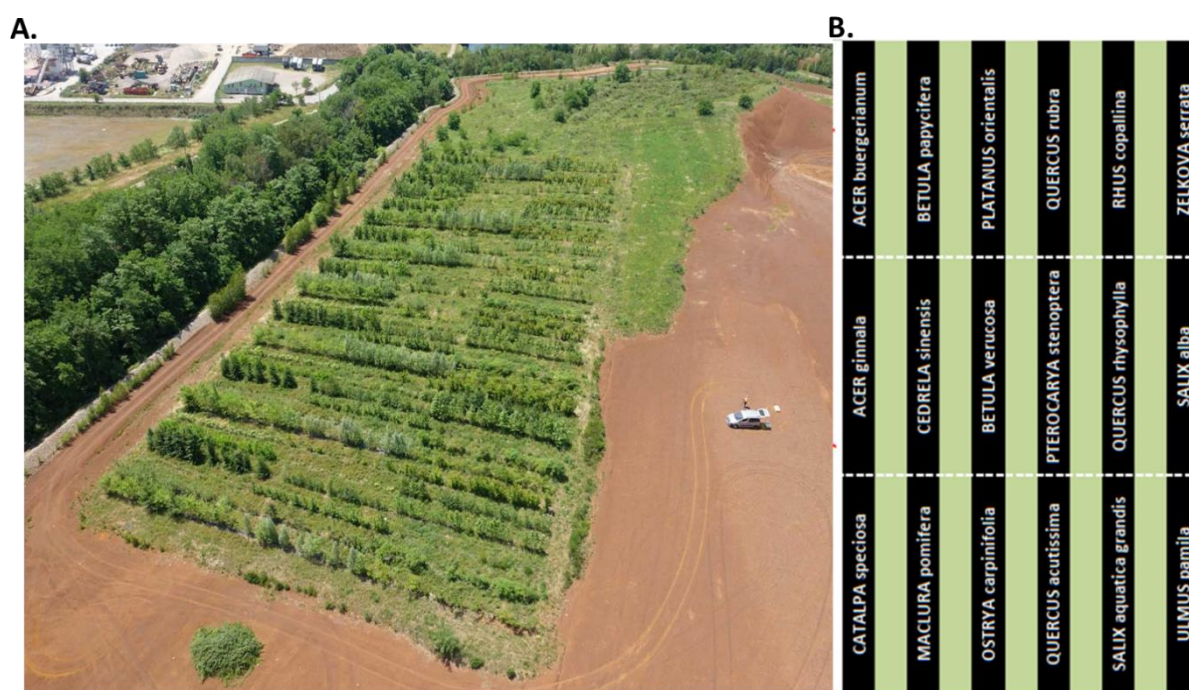


Figure 35 : Parcelle expérimentale avec les 18 espèces d'arbres plantées dans le cadre du Projet PROLIPHYT A. vue aérienne de la plantation formée de 8 lots identiques acquise par drone, B. disposition des espèces ligneuses d'un lot.

Tableau 12 : Liste des différentes espèces ligneuses plantées sur le site d'Ochsenfeld dans le cadre du projet PROLIPHYT.

Abréviation	Espèce	Abréviation	Espèce
Abu	<i>Acer buergerianum</i>	Pst	<i>Pterocarya stenoptera</i>
Agi	<i>Acer ginnala</i>	Qac	<i>Quercus acutissima</i>
Bpa	<i>Betula papyrifera</i>	Qrh	<i>Quercus rhysophylla</i>
Bpe	<i>Betula pendula</i>	Qru	<i>Quercus rubra</i>
Csp	<i>Catalpa speciosa</i>	Rco	<i>Rhus copallina</i>
Csi	<i>Cedrela sinensis</i>	Sag	<i>Salix aquatica grandis</i>
Mpo	<i>Maclura pomifera</i>	Sal	<i>Salix alba</i>
Oca	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Upu	<i>Ulmus pumila</i>
Por	<i>Platanus orientalis</i>	Zse	<i>Zelkova serrata</i>

3.3 Méthodes analytiques

3.3.1 Mesures écophysiological

Les mesures de la conductance stomatique maximale (g_{smax} exprimée en mol H₂O/m²/s) et de la concentration intercellulaire en CO₂ (C_i exprimé en μmol CO₂/ mol air) ont été effectuées à l'aide d'un appareil portable de mesure d'échanges gazeux à système ouvert (Licor-6400 Lincoln, Nebraska, USA). La méthode consiste à enfermer la feuille à analyser dans la chambre de 6 cm² de l'appareil jusqu'à la stabilisation de g_{smax} (environ 3 min). Une pompe assure la circulation de l'air dans le système et l'amène vers l'analyseur de gaz à infra-rouge (IRGA pour Infra-Red Gas Analyzer). Le CO₂ est dosé par mesure différentielle entre la cellule de mesure et une cellule de référence de 400 ppm de CO₂. La concentration en CO₂ du mélange gazeux pénétrant dans la chambre de mesure est ajustée à la valeur souhaitée par un injecteur à CO₂ qui utilise comme source des cartouches sous haute pression de CO₂ liquéfié. Les mesures ont été réalisées en utilisant une concentration de 400 ppm de CO₂, une température de bloc de 30 °C, une densité de flux de photons de 1400 μmol/m²/s et une humidité de l'air ambiante (de 50 à 80%) au moment de la mesure. Au cours des mesures, l'analyseur enregistre le flux et calcule les variations des taux de CO₂ et H₂O selon les équations de (Von Caemmerer and Farquhar, 1981). Pour obtenir g_{smax} , le taux de transpiration E est calculé comme suit :

$$E = \frac{Q_m \times (X_{\text{out}} - X_{\text{in}})}{S \times (1 - X_{\text{out}})}$$

Où Q_m est le débit d'air molaire (mol/s), X_{in} et X_{out} sont des rapports molaires secs H₂O de l'air entrant (mol H₂O/mol air) et de l'air sortant (mol H₂O/mol air) de la chambre respectivement, S est la surface des feuilles (m²).

g_{smax} est donc calculée en utilisant E comme suit :

$$g_{smax} = \frac{E \times \left(1 - \frac{X_{leaf} + X_{out}}{2}\right)}{X_{leaf} - X_{out}}$$

Où X_{leaf} est la concentration molaire de vapeur d'eau dans la feuille (mol H₂O/ mol air).

Des paramètres tels que la production de chlorophylle (Chlorophyll Content Index : CCI) et l'efficacité du photosystème II (PSII), permettant d'évaluer l'état physiologique des plantes utilisées dans les expériences en mésocosme au laboratoire, ont été mesurés. La chlorophylle traduisant l'état nutritionnelle de la plante a été étudiée à l'aide d'un appareil portatif (OptiSciences CCM-200, Tyngsboro, USA) qui calcule le CCI via le rapport de la mesure de la transmittance à 660 et 940 nm, comme décrite par (Markwell et al., 1995).

La mesure de l'efficacité du PSII qui traduit l'état de stress des plantes a été réalisée via un fluorimètre portatif (MINI-PAM II, Walz, Allemagne). Avant les mesures, les plantes étaient placées dans l'obscurité pendant environ 1 heure. Les paramètres qui étaient mesurés par le fluorimètre sont : F_0 (fluorescence à l'état initial) qui correspond à la fluorescence minimale dans l'état adapté à l'obscurité ; F_m (fluorescence maximale) qui est la fluorescence maximale dans l'état adapté à l'obscurité après application d'un flash lumineux ; F_v/F_m qui est le rapport de la fluorescence variable ($F_m - F_0$) et de F_m , traduit l'efficacité du PSII et est basée sur la méthode de (Maxwell and Johnson, 2000). Sa valeur est d'environ 0.8 chez une plante saine, et diminue en cas de stress.

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Durant chaque série, une mesure de F_0 , F_m et F_v/F_m a été effectuée à l'obscurité par réplicat, sur la même feuille que la mesure du CCI. Avant chaque série de mesures, la calibration de l'appareil était effectuée via une mesure à vide sans végétal, ainsi que les réglages de ses paramètres internes (gain : 2, damp : 2, sat-int : 10 et sat-width : 0,6 s).

3.3.2 Analyse par télédétection

L'approche utilisée pour transformer g_{smax} mesuré au niveau des feuilles à une estimation de la conductance de la canopée (g_{cmax}) a consisté à calculer le **LAI** par une méthode de télédétection basée sur les drones. Le **NDVI** et la **hauteur des arbres** ont été également déterminés par cette méthode. Les différentes étapes étaient : l'acquisition de la réflectance de la canopée à partir de photos aériennes, le traitement des données résultantes et enfin l'analyse des données finales. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide de deux appareils photo numériques haute résolution, Sony (RX100 M3 ; Tokyo, Japon) pour les bandes rouge (620 à 670 nm), verte (490 à 570 nm) et bleue (450 à 490 nm) et Canon (S110 ; Tokyo, Japon, modifié par LDP LLC Max, Carlstadt, USA) pour la bande NIR (680 à 800 nm), avec une résolution de 8 mégapixels, embarqués sur le drone TurtleQuad® conçu Gilles GALLINET de l'entreprise Hekladonia. Les photos acquises ont permis de générer un premier modèle 3D MNS (Modèle Numérique de Surface) à l'aide du logiciel photogrammétrique Metashape-AGISOFT (version 1.6.1, Agisoft LLC, Saint Petersburg, Russie). Les métadonnées GPS ont été utilisées pour le géo-positionnement et la reconstruction photogrammétrique. À partir du MNS, toujours à l'aide de Metashape-AGISOFT, une projection orthomosaïque a généré deux orthophotographies multibandes : l'une avec des bandes rouge, verte et bleue, et la seconde avec une bande NIR (Figure 25). La représentation en 3D de la surface du sol sans végétation (Modèle Numérique de Terrain : MNT) a été enregistrée par acquisition terrestre traditionnelle des données d'altitude à l'aide d'un système de positionnement global de haute précision à cinématique en temps réel (RTK-GPS). Les détails concernant la calibration des modèles ont été données dans la section « Remote sensing » du chapitre 1. Les données des orthophotographies multibandes ont été traitées à l'aide de QGIS version 3.10.1-A Coruña (QGIS Development Team, 2018).

La surface foliaire (SF) de la canopée des arbres a été mesurée sur Agisoft Metashape en délimitant manuellement la couronne des arbres. La surface de sol (SS) que couvre la plante a été calculée sur QGIS, également par une délimitation manuelle. Le LAI est obtenu en réalisant le rapport entre la somme de la SF et l'unité de SS.

$$\text{LAI} = \frac{\text{SF}}{\text{SS}}$$

L'estimation de la hauteur des arbres a été réalisée grâce au Modèle Numérique de Canopée (MNC) en soustrayant le MNT du MNS (Figure 37) sous QGIS.

$$\text{MNC} = \text{MNS} - \text{MNT}$$

Les valeurs NDVI ont été calculées selon l'équation suivante à l'aide de QGIS, où NIR et R sont les valeurs de réflectance dans les longueurs d'onde du proche infrarouge et du rouge, respectivement.

$$\text{NDVI} = \frac{\text{NIR} - \text{R}}{\text{NIR} + \text{R}}$$



Figure 36 : Parcelle PROLIPHYT, site d'Ochsenfeld A. bande visible et B. bande NIR

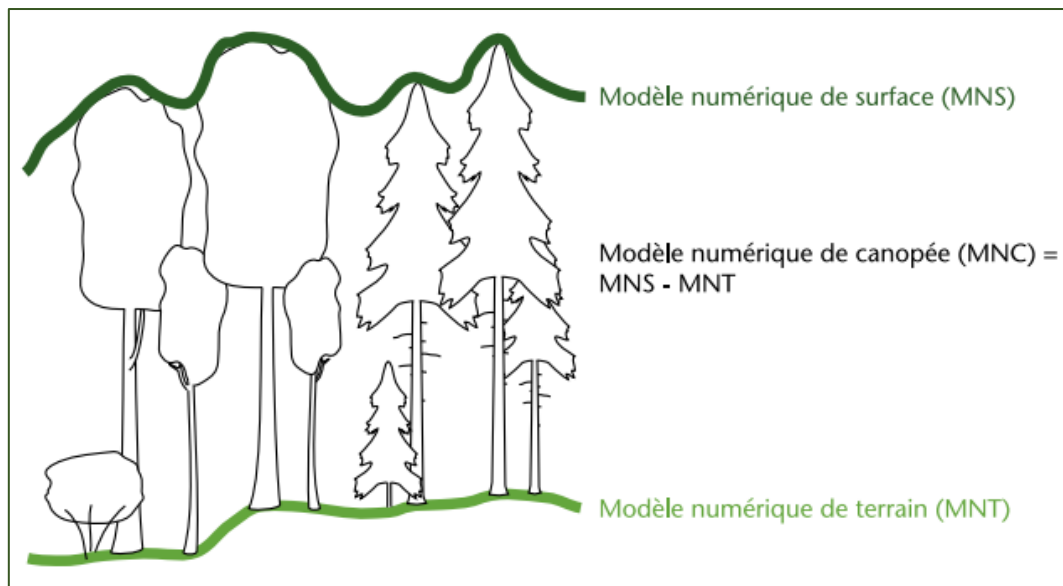


Figure 37 : Estimation de la hauteur des arbres à l'aide du MNC obtenu en soustrayant le MNT du MNS (Bonnet et al., 2011).

3.3.3 Préparation des échantillons et dosage des ETM

Pour doser des ETM dans les plantes, des échantillons des feuilles ont été prélevés sur chaque réplicat, puis séchés à 40 °C à l'étude pendant 7 jours, et ensuite broyés à l'aide d'un broyeur à bille (Broyeur MM300, Retsch). Pour chaque échantillon, environ 250 mg de MS ont été minéralisés avec un mélange de 3,5 ml de HNO₃ et 2 ml de H₂O₂ à l'aide du « digiprep ». Cet appareil est approprié pour les minéralisations en routine, dans le sens où il permet de minéraliser 54 échantillons simultanément dans des tubes jetables minimisant ainsi le nombre de manipulations et les risques de contamination. Une fois la minéralisation terminée, les solutions obtenues ont été filtrées à l'aide de disque de microfibre Whatman porosité de 1 µm pour retirer les fragments d'échantillons qui n'auraient pas été digérés.

Pour avoir la fraction extractible au CaCl₂ de sols, 2,5g d'échantillon sec ont été pesés, mis dans des tubes, puis complétés par 25 ml de CaCl₂ à 0,01 M. Les solutions ainsi obtenues ont été agitées pendant 3 h à une température ambiante (100 tr/min dans un agitateur automatique). Après agitation, elles ont été centrifugées à 10000 tr/min pendant 10 min, puis le surnageant filtré par du papier filtre Whatman 1 mm. Le filtrat a été recueilli et stocké jusqu'à l'analyse.

Pour chaque série d'analyse, deux blancs et deux échantillons de feuilles de tabac certifiées basma oriental (INCT-OBTL-5, LGC Promochem, Molsheim, France) ont été analysés pour s'assurer de la justesse des mesures. Seuls les éléments qui ont un taux de recouvrement compris entre 80 et 120% sont retenus.

Le dosage des ETM a été réalisé soit par :

- Spectrométrie d'Emission Atomique à Plasma à Couplage Inductif (ICP/AES) pour les différents échantillons étudiés, qui consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon, ou parfois d'hélium, c'est-à-dire que les atomes de la matière à analyser sont transformés en ions par une flamme. L'échantillon pénètre généralement dans le plasma sous une forme condensée (liquide ou solide), et doit donc subir les changements d'état suivants : fusion (pour les solides), vaporisation, ionisation. L'introduction a lieu au centre du plasma, parallèlement au flux de gaz plasmagène.

- Spectroscopie d'Absorption Atomique (SAA) qui utilise le principe selon lequel les atomes (et les ions) peuvent absorber la lumière à une longueur d'onde spécifique et unique. Lorsque cette longueur d'onde spécifique de la lumière est fournie, l'énergie (lumière) est absorbée par l'atome. Les électrons de l'atome passent alors de l'état fondamental à un état excité. La quantité de lumière absorbée est mesurée et la concentration de l'élément dans l'échantillon peut être calculée.

3.3.4 Analyse microbiologique

Les différentes souches bactériennes utilisées dans ce travail de thèse (Tableau 13) ont été isolées sur le site d'Ochsenfeld dans le cadre d'un travail de thèse précédent (Zappelini et al., 2018) et sélectionnées pour leur capacité à favoriser la croissance des plantes et/ou à tolérer des ETM. La composition des différents milieux de culture utilisés est présentée en Annexes. Le protocole d'isolement, d'identification et des caractérisations des souches a été détaillé dans un article précédent (Zappelini et al., 2018). Brièvement, l'isolement des bactéries est effectué par la méthode des suspensions-dilutions selon le protocole suivant : les fractions de sol ont été homogénéisées dans 45 ml de MgSO₄ 10 mM et agitées à 100 tr/min pendant 15 min à température ambiante. 1 ml a été utilisé pour effectuer des dilutions en série, et 100 µl ont été étalés sur le milieu agar 284. Les morphotypes uniques ont été isolés et ensuite conservés dans des cryotubes dans un bouillon cœur-cerveau (Roth, D) avec 15 % de glucosate de glycérol à -

80°C. L'identification des isolats a été réalisée par des méthodes de la biologie moléculaire (extraction, PCR, séquençage).

Tableau 13 : Caractéristiques fonctionnelles des isolats utilisés (Zappelini et al., 2018)

Isolats	IAA	OA	P	SID	Cr (mM)			Mn (mM)			Zn (mM)			
					0.1	0.25	0.5	5	10	25	1	2.5	5	10
<i>Arthrobacter sp.</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Phyllobacterium sp.</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Variovorax sp.</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Le Tableau 13 présente « les caractéristiques PGPR » et la tolérance aux ETM des 5 isolats étudiés. Les caractéristiques PGPR testés sont la production d'auxine (IAA), la production d'acide organique (OA), la solubilisation du phosphate (P) et la production de sidérophores (SID). La tolérance aux ETM est testée sur du Cr de 0,1 mM à 0,5 mM de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, du Mn de 5 à 25 mM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, et du Zn de 1 à 10 mM de $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Comme ces 5 isolats ont *in-vitro* des caractéristiques bénéfiques pour la croissance des plantes, il a été testé en condition réelle, leur effet sur la croissance des plantes, et la mobilisation et le transfert des ETM. A cet effet, un inoculum bactérien a été préparé pour amender des plantes de bouleau cultivé sur le substrat de gypse rouge dans une approche expérimentale du laboratoire au terrain. Pour préparer l'inoculum bactérien, les isolats bactériens ont été cultivés dans le milieu 284 à 25 °C sur un agitateur rotatif à 150 tr/min. Les cultures bactériennes (environ 10^8 CFU/ml) ont été ensuite récoltées par centrifugation (10 000 tr/min, 10 min) et remises en suspension dans un tampon stérile de MgSO_4 10 mM pour obtenir l'inoculum. Au pied de chaque plant, 10 ml de l'inoculum ont été déposés.

Dans l'étude en mésocosme, les fonctionnalités du substrat ont été évaluées par la mesure des activités enzymatiques. Pour ce fait, 16 différentes activités enzymatiques microbiens (Tableau 14) ont été déterminées au niveau des racines, des rhizosphères et du sol, en utilisant des substrats fluorogènes contenant du 4-méthyl-umbelliferyl (MUF) ou du 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) comme fluorophores. Les enzymes ont été désorbées par une procédure d'échange hétéromoléculaire (Ferrarini et al., 2020). Brievement, le protocole utilisé est la suivante : 0,4 g de sol humide ou 0,1 g de racines fines fraîches ont été mélangés

avec 1,4 ml d'une solution contenant 3% de lysozyme et des billes de verre ou de céramique et placées dans des tubes de 2 ml, puis secouées à 1 800 tr/min pendant 3 min, et centrifugées à 20 000 tr/min pendant 5 min. Le surnageant contenant les enzymes désorbées a été réparti dans des microplaques blanches à 384 puits avec les tampons appropriés pour quantifier par fluorométrie les activités enzymatiques exprimées en nmol de MUF ou d'AMC / h /g de matière organique.

Tableau 14 : Les différents activités enzymatiques étudiées

Activité enzymatique	Impliquée dans	Abréviation
arylsulfatase	Cycle de S	aryS
chitinase	Cycle de N	chit
leucine-aminopeptidase		leu
trypsin-like protease		trip
acid phosphomonoesterase	Cycle de P	acP
alkaline phosphomonoesterase		alkP
phosphodiesterase		bisP
pyrophosphate-phosphodiesterase		piroP
alpha-glucosidase	Cycle de C	alfaG
beta-glucosidase		betaG
alpha-galactosidase		alfaGAL
beta-galactosidase		betaGAL
glucuronidase		uroni
xylosidase		xilo
butyrate-esterase	Hydrolyse des liaisons ester	butir
nonanoate-esterase		nona

Le Mn soluble est la seule forme disponible pour une absorption par les plantes. Nous avons donc étudié la capacité de nos 5 isolats bactériens à solubiliser les oxydes de Mn. Le test de solubilisation a été réalisé à partir des cultures liquides en milieu 284 enrichi avec de gypse rouge d'Ochsenfeld utilisé comme source de Mn. Le protocole mis en place est le suivant : Dans chaque erlenmeyer de 500 ml, 90 % du volume total (soit 135 ml) de milieu 284 sont versés, puis complétés par 10 % du volume total (soit 15 ml) de la solution bactérienne de la souche étudiée. 2% (p/v) soit 3 g du sol d'Ochsenfeld stérilisé pour un volume final de 150 ml, est ajouté au milieu. Les erlenmeyers sont en suite placés à 25°C dans des conditions d'agitation continue (150 tr/min). Des aliquotes de 5 ml sont recueillis puis centrifugés à 10 000 tr/min. Les surnageants sont récupérés et filtrés à l'aide de filtres de 0,22 µm. Ces filtrats sont enfin analysés par SAA.

Parmi les 5 isolats testés, celui qui a la plus forte capacité de solubilisation de Mn, a été étudié au niveau génomique et protéomique. Son génome complet a donc été séquencé et étudié à l'aide de la plateforme en ligne « galaxy » (<https://usegalaxy.org/>) (Figure 38). Le protocole utilisé est le suivant : l'ADN génomique a été extrait par des lyses cellulaires mécaniques et chimiques, en additionnant des phases de broyage et l'ajout d'agents chimiques (1M de solution d'extraction composée de 10 ml de Tris, 1,86 g de KCl, 0,37 g d'EDTA, et 1 M de NaOH). Les ADN extraits ont par la suite été envoyés à la plateforme de séquençage Microsynth. La plateforme a effectué deux PCR, la purification des produits PCR, et le séquençage par un séquenceur Sanger 3130. Les études bioinformatiques que nous avons réalisées sur la plateforme en ligne « galaxy » sont les suivantes :

- Le prétraitement des données de séquençage a été effectué par l'élagage (trimming des séquences) afin de retirer les séquences de mauvaise qualité et les séquences d'amorces utilisées lors du séquençage, à l'aide de l'outil *Filter Sequences Sickle*.

- L'assemblage de *novo* du génome complet a été réalisé à l'aide de l'outil *Assembly Spades* pour assembler les reads générés afin d'obtenir un ensemble de séquences appelé contigs, de déterminer la taille de génome, et d'identifier l'isolat.

- L'alignement est la recherche d'une séquence d'intérêt (gène impliqué dans la solubilisation de Mn) dans un génome comparant les séquences d'ADN obtenus à la base de données GenBank du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI) par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool pour outil de recherche basique d'alignement local) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Différentes recherches BLAST ont été menées selon l'objectif : blastn (pour la recherche d'une séquence nucléotidique), blastp (pour la recherche d'une séquence protéique), et blastx (pour la recherche d'une séquence nucléotidique).

- L'annotation du génome qui est la détermination des gènes présents dans un génome et de leur fonction a été réalisée en utilisant 2 approches en parallèle pour plus de sensibilité et de précision : l'approche *ab initio* à l'aide des modèles de Markov cachés sans base de données, et l'approche par entraînement à l'aide de base de gènes connus et validés.

- Pour voir la relation de l'isolat étudié avec les souches les plus proches, un arbre phylogénétique a été construit en utilisant 498 génomes représentatifs des différentes espèces du genre avec un échantillonnage de 3 souches par espèce par la technique MLSA (MultiLocus

Sequencing Analysis). La phylogénie a été réalisée en utilisant une approche bayésienne à l'aide de logiciel MrBayes (<http://nbisweden.github.io/MrBayes/>) avec un modèle GTR+G. La figure a été construite à partir de Itols.

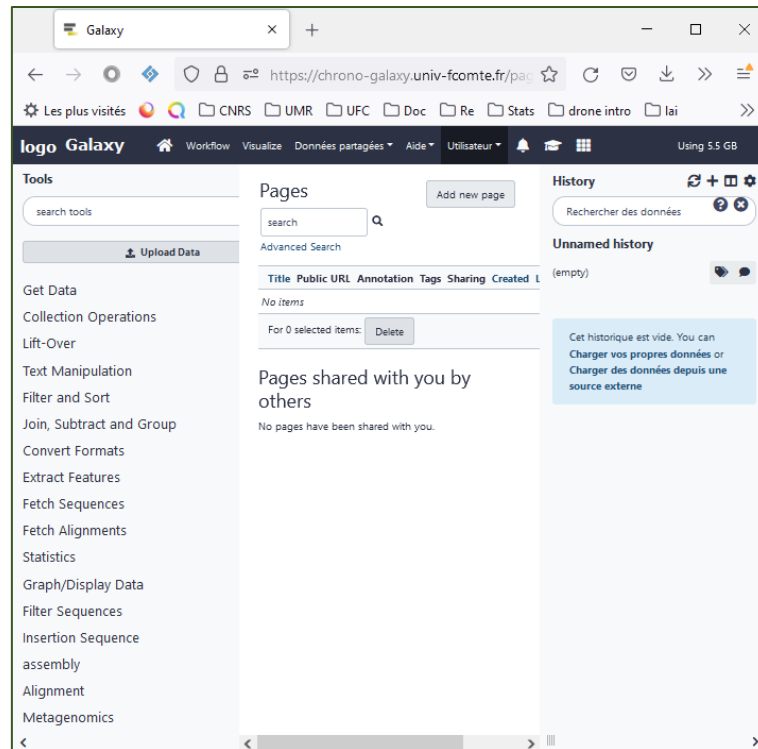


Figure 38 : Environnement de travail de la plateforme Galaxy

3.4 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel libre R version 4.0.4 pour Windows (R Core Team, 2021), en utilisant les packages suivants : ggplot2, corrplot, cowplot, FactoMineR, factoextra, agricolae, vegan et caret. Les tests ont été considérés comme significatifs lorsque $P < 0,05$. L'homoscédasticité qui permet de vérifier l'homogénéité des variances a été réalisé par le test de Bartlett si l'échantillon $n < 50$, et par le test de Levene si l'échantillon $n > 50$. En cas d'un résultat non significatif la normalité des données a été vérifié par le test de Shapiro-Wilk. Si ce dernier n'est pas significatif, les données sont alors paramétriques et ont été analysées par un test ANOVA (ANalysis Of VAriance). En cas de résultat significatif pour l'homoscédasticité ou la normalité, les données peuvent être transformées en \log_{10} . Si les données sont toujours non paramétriques le test statistique employé a été celui de Kruskal-Wallis.

Résultats

4 Résultats

Cette partie présente les différents résultats obtenus durant ce travail de thèse. Elle est subdivisée en 3 chapitres dont chacun répond précisément à un objectif spécifique de la thèse et un enjeu particulier du site d'études, sous forme d'une publication rédigée en anglais. Je suis 1^{er} auteur des trois publications, j'ai participé en collaboration avec mes co-auteurs, à la réalisation de toutes les principales étapes de ce travail : mise en place des expérimentations, prélèvements et analyses des échantillons, traitement statistique des données obtenues, et rédaction des articles.

Le chapitre 1 a pour but de répondre à la question de l'amélioration de la qualité agronomique du substrat afin de permettre une meilleure croissance végétale de l'espèce modèle *B. pendula* qui malgré sa colonisation de façon spontanée du site ne se développe pas de façon optimale. Cette étude a été publiée dans la revue « *Ecological Engineering* ».

Malabad A.M., Zapata-Carbonell J., Maurice N., Ciadamidaro L., Pfendler S., Tatin-Froux F., Ferrarini A., Fornasier F., Toussaint M., Parelle J., Chalot M., 2022. Digestate improved birch (*Betula pendula*) growth and reduced leaf trace element contents at a red gypsum landfill. *Ecol. Eng.* 185, 106815. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2022.106815>

Après l'étude des amendements organique et biologique, le chapitre 2 a pour objectif d'évaluer la capacité de transpiration des différentes espèces d'arbre sur le site d'études. Des techniques innovantes de télédétection par drone ont été utilisées pour déterminer le NDVI et le LAI des 16 espèces d'arbres. Ces résultats combinés aux valeurs de conductance stomatique obtenues grâce aux mesures d'échanges gazeux, ont permis d'évaluer la conductance de la canopée de ces différentes espèces d'arbres étudiées. Cette étude a été publiée dans « *Journal of Hazardous Materials* ».

Malabad, A.M., Tatin-Froux, F., Gallinet, G., Colin, J.-M., Chalot, M., Parelle, J., 2022. A combined approach utilizing UAV 3D imaging methods, in-situ measurements, and laboratory experiments to assess water evaporation and trace element uptake by tree species growing in a red gypsum landfill. *J. Hazard. Mater.* 425, 127977. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127977>

Le chapitre 3 présente l'étude génomique et protéomique de *Pseudomonas sp.*, un isolat qui a une forte capacité de solubilisation de Mn, et qui est issu de site d'étude. Ce chapitre présenté sous forme d'article est en cours de préparation pour une publication.

Malabad, A.M., Pfendler, S., Armengaud, J., Valot, B., Chalot, M., 2022. Proteogenomics insights of a high manganese-solubilisation capacity *Pseudomonas sp* isolate from a red gypsum landfill. *En cours de préparation.*

4.1 Chapitre I. Déterminer l'amendement qui pourrait améliorer la production végétale et augmenter la capacité de stabilisation ou d'accumulation des ETM.

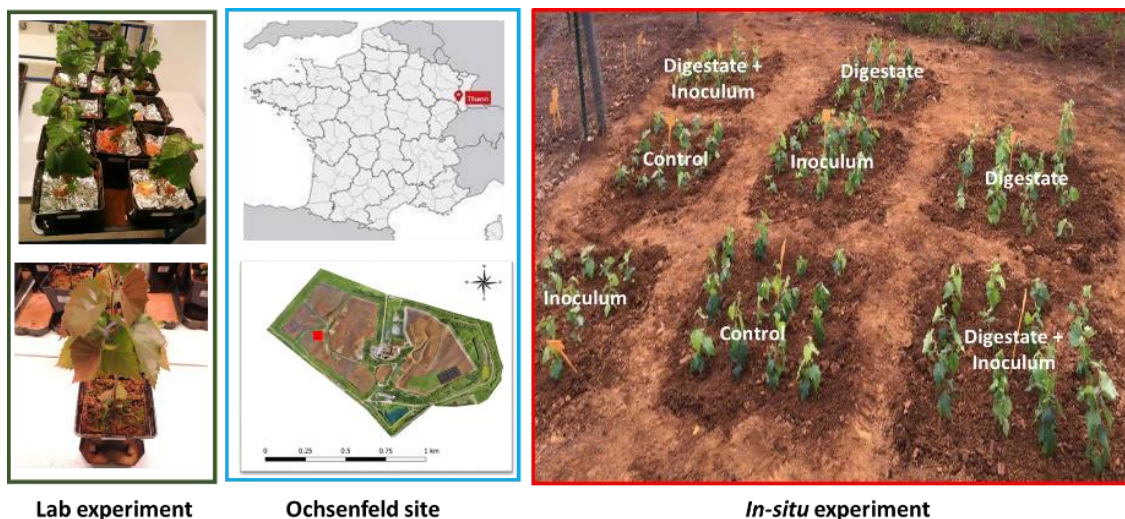
4.1.1 Contexte de la publication I

Le gypse rouge est un substrat riche en ETM notamment le Fe et le Mn, mais pauvre en nutriment et en microorganismes, ce qui constitue l'une des principales contraintes pour sa revégétalisation. Dans le présent travail, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation de digestat organique et de consortiums de bactéries PGPR pourrait améliorer le fonctionnement du gypse rouge, et *in-fine* accroître le développement de *Betula pendula*, l'espèce pionnière du site d'étude. Les objectifs de ce travail étaient donc i) de déterminer la dose minimale de digestat nécessaire pour obtenir une augmentation significative de la biomasse de bouleau dans une expérience en pot et ii) d'évaluer l'effet de digestat et l'inoculum bactérien sur la croissance de bouleau et la teneur foliaire en ETM, ainsi que sur les indicateurs enzymatiques clés du fonctionnement du sol, en laboratoire ou sur le terrain. Le dosage des activités enzymatiques a été réalisé en collaboration avec des collègues de l'Université Catholique du Sacré-Cœur, et du Conseil pour la Recherche Agricole et l'Analyse de l'Economie Agricole, en Italie. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article publié dans la revue « *Ecological Engineering* ».

Titre : Le digestat améliore la croissance du bouleau (*Betula pendula*) et réduit la teneur en éléments traces des feuilles dans une décharge de gypse rouge.

Revue : *Ecological Engineering*

Eléments essentiels : - Le digestat et l'inoculum bactérien ont été utilisés pour améliorer la croissance du bouleau sur le gypse rouge. - Le digestat a augmenté significativement la biomasse du bouleau ainsi que la teneur en P et K des feuilles. - Les deux amendements ont diminué la teneur en Fe, Mn et Zn des feuilles. - Les fonctionnalités du sol évalués à partir des activités enzymatiques ont été améliorées par les amendements au digestat.



Résumé :

La revégétalisation des terrils industriels et des résidus miniers peut restaurer les fonctions clés du sol et réduire les impacts environnementaux des contaminants. Ces sites marginaux sont souvent caractérisés par des niveaux phytotoxiques d'éléments traces (ETM) (Cu, Fe, Mn, et Zn) et un faible statut en nutriments (N, P, et K). L'objectif de cette étude était de tester l'effet du digestat et de l'inoculum bactérien sur les propriétés physico-chimiques du sol (pH, Mn extractible par CaCl_2 , et activités enzymatiques microbiennes), ainsi que sur la croissance et la physiologie du bouleau (*Betula pendula*), sur un substrat de gypse rouge dans une approche expérimentale de laboratoire à terrain. La biomasse des bouleaux amendés avec du digestat (D0,05% N) était en moyenne 2 et 6 fois plus importante que celle des bouleaux témoins dans les expériences de laboratoire et de terrain, respectivement. Une concentration plus élevée de digestat (0,1 % de N) a eu un effet inhibiteur sur la croissance des plantes et a réduit de 40 % le taux de survie des plantes amendées par rapport aux témoins. Le traitement au digestat (D0,05%) a augmenté significativement les teneurs en P et K des feuilles, tout en diminuant les teneurs en Ca, Fe et Mn des feuilles. Le digestat a également augmenté certaines activités enzymatiques clés du sol pour le métabolisme du C, N, P et S de plus de 10 fois par rapport au sol témoin. Dans un scénario de phytomanagement, le digestat serait une ressource d'amendement privilégiée pour la production de biomasse de bouleau propre sur un terril de gypse rouge contaminé, car les bouleaux amendés avec du digestat présentaient une teneur en ETM foliaire inférieure et en nutriments supérieure aux bouleaux témoins.

4.1.2 Publication I

Digestate improved birch (*Betula pendula*) growth and reduced leaf trace element contents at a red gypsum landfill

Abdoulaye Mahamat Malabad ^a, José Zapata-Carbonell ^a, Nicolas Maurice ^a, Lisa Ciadamidaro ^a, Stephane Pfendler ^a, Fabienne Tatin-Froux ^a, Andrea Ferrarini ^b, Flavio Fornasier ^{c,d}, Marie-Laure Toussaint ^a, Julien Parelle ^a, Michel Chalot ^{a,e,*}

^a Chrono-environnement UMR6249, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000, Besançon, France

^b Department of Sustainable Crop Production, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, 29122, Italy

^c CREA – Centro Viticoltura ed Enologia, Via Trieste 23, Gorizia, 34170, Italy

^d SOLIOMICS srl, Via del Cotonificio, 129/B 33100 Udine, Italy

^e Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, 54000 Nancy, France

* Corresponding author at: Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP : 71427, 25211 Montbéliard, France.

E-mail address: michel.chalot@univ-fcomte.fr (M. Chalot).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2022.106815>

Ecological Engineering 185 (2022) 106815



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Ecological Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoleng



Digestate improved birch (*Betula pendula*) growth and reduced leaf trace element contents at a red gypsum landfill

Abdoulaye Mahamat Malabad ^a, José Zapata-Carbonell ^a, Nicolas Maurice ^a, Lisa Ciadamidaro ^a, Stephane Pfendler ^a, Fabienne Tatin-Froux ^a, Andrea Ferrarini ^b, Flavio Fornasier ^{c,d}, Marie-Laure Toussaint ^a, Julien Parelle ^a, Michel Chalot ^{a,e,*}

^a Chrono-environnement UMR6249, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France
^b Department of Sustainable Crop Production, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza 29122, Italy
^c CREA – Centro Viticoltura ed Enologia, Via Trieste 23, Gorizia 34170, Italy
^d SOLIOMICS srl, Via del Cotonificio, 129/B 33100 Udine, Italy
^e Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, 54000 Nancy, France



Abstract:

Revegetation of industrial landfills and mine tailing may restore key soil functions and reduce the environmental impacts of contaminants. These marginal sites are often characterized by phytotoxic levels of trace elements (TE) (Cu, Fe, Mn, and Zn) and low nutrient status (N, P, and K). The aim of this study was to test the effect of digestate and bacterial inoculation on soil physicochemical properties (pH, CaCl₂ extractable Mn, and microbial enzyme activities) and birch (*Betula pendula*) growth and physiology on a red gypsum substrate in a lab-to-field experimental approach. The biomass of birches amended with digestate (D0.05% N) was on average 2- and 6-fold greater than that of control birch in the laboratory and field experiments, respectively. A higher concentration of digestate (0.1% N) had an inhibitory effect on plant growth, and reduced the survival rates of amended plants by 40% as compared with controls. The digestate (D0.05% N) treatment significantly increased leaf P and K contents while decreasing leaf Ca, Fe and Mn contents. Digestate also increased some key soil enzyme activities of C, N, P and S metabolism by more than 10-fold compared with the control soil. In a phytomanagement scenario, digestate would be a preferred amendment resource for the production of clean birch leaf biomass on contaminated red gypsum landfill, as birch trees amended with digestate had lower leaf TE and higher leaf nutrient contents than control birches.

Keywords:

Digestate, bacterial inoculum, *Betula pendula*, trace element, manganese, soil functionalities.

Highlights:

Digestate and bacterial inoculum were used to improve birch growth on red gypsum.

The digestate significantly increased birch biomass as well as leaf P and K content.

The two amendments decreased the leaf Fe, Mn, and Zn contents.

Soil functionalities were enhanced upon digestate amendments.

Abbreviations

aryS, arylsulfatase; alfaG, alpha-glucosidase; betaG, beta-glucosidase; alfaGAL, alpha-galactosidase; betaGAL, beta-galactosidase; trip, trypsin-like protease; xilo, xylosidase; uroni, glucuronidase; chit, chitinase; leu, leucine-aminopeptidase; acP, acid phosphomonoesterase; bisP, phosphodiesterase; piroP, pyrophosphate-phosphodiesterase; alkP, alkaline phosphomonoesterase; butir, butyrate-esterase; nona, nonanoate-esterase; MUF, 4-methylumbelliferyl; AMC, 7-amino-4-methyl coumarin.

I.1. Introduction

The vegetation provides many functions to the ecosystem such as stabilisation to avoid soil loss and erosion. It controls soil moisture through evapotranspiration and local temperature changes. It is food for major producers in trophic chains, and a niche for CO₂ consumers and O₂ producers (Chapin et al., 2011). These functions are severely impaired in marginal lands, such as mine and landfill soils, which are often considered drastically disturbed (Thangavel et al., 2017). The lack of essential nutrients on these sites is one of the main constraints for revegetation (Sandell Festin et al., 2019). For instance, N values were very low (0.005% ± 0.0006) in residual red gypsum from titanium dioxide (TiO₂) production at the Ochsenfeld site in eastern France (Zappelini et al., 2018). Given the shortages of essential nutrients, Bradshaw (1997) determined that applied management for mitigation could include selection of plant species for revegetation and appropriate techniques during planting. Therefore, the commonly adopted strategy is to fertilize to increase the mineral content available to plants. However, the use of these fertilizers must be economically justified, *i.e.*, fertilizer costs must be less than the income from grains yield, or biomass produced (West, 2014). Particularly for revegetation in sites with acidity or alkalinity problems and the presence of a high content of trace elements (TE), it has been recommended that tolerant vegetation and necessary fertilization be applied prior to seeding (Tordoff et al., 2000).

A common fertilizer that is economic feasible is digestate. Digestate is one of the by-products of anaerobic digestion of raw organic residues from agriculture, the other being biogas production (Do and Scherer, 2012). Digestate can be in solid phase (10-20% of water content) or liquid phase (80-90% of water content) and is used due to its richness in nutrients such as P, K, Ca, and a high NH₄⁺/N ratio (Lošák et al., 2012), which are important nutrients for plant development. More information on the properties of digestate and application examples have

been compiled in the reviews by Makádi et al., (2012), and Möller and Müller, (2012). Some studies on polluted sites have included digestate as a nutrient contributor to microbial communities for the remediation soils contaminated with total petroleum hydrocarbons (Gielnik et al., 2019). Digestate has also been used as a cover layer for the neutralization and geochemical stabilization of flooded sulfidic tailings from the Boliden mine in Northern Sweden, which reducing metal precipitation of the tailings and maintaining conditions for degradation of organic matter (Jia et al., 2015). More recently, the use of digestate has been investigated for other factors. For instance, microalgae have been used for the consumption of nutrients in liquid digestate to avoid potential drawbacks of its use on agricultural lands, which can be legislated (Stiles et al., 2018): NH₃ volatilization, soil contamination (biologically, chemically or physically) and *ex situ* eutrophication through nutrient lixiviation (Xia and Murphy, 2016). The last article outlines the importance of determining the proper dosage and management of digestate as a soil amendment.

As an alternative to chemical amendments, the use of bacterial inoculum has been widely studied in the past, given its ability to promote tree growth or confer higher tolerance to tree growth (Chen et al., 2010). Therefore, in addition to digestate, bacteria can be used to enhance plant growth. Bacteria can influence the mobility and availability of element to plants through the release of chelating agents, acidification, P solubilisation or redox changes (Jing et al., 2007). Mechanisms involved by bacteria are siderophore production, production of enzymes such as 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and indole-3-acetic acid (Hardoim et al., 2008; Rajkumar et al., 2010), the fixation of N (Triplett, 1996) and/or the increased P and K availability (Kuklinsky-Sobral et al., 2004). The use of bacterial inoculum has been tested in several marginal environments to promote plant development. For instance, at the Sigma-Lamaque gold mine, tailings are a harsh environment for plant development; however, *Picea glauca* seedlings were found *in situ* with different bacterial communities than those present in the surrounding forest. In addition, an experiment under controlled conditions showed synergistic interactions of bacterial and mycorrhizal consortia (Nadeau et al., 2018). The bacteria used for inoculum in the various plants were different, but many strains were closely related to common soil bacteria representative of genera such as *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Arthrobacter* (Lodewyckx et al., 2002). Substrate treatments with digestate and/or bacterial inoculum, by increasing the biomass of the plants, could affect TE content. However, to our knowledge, the effects of these treatments on TE mobilization and transfer are poorly described in the literature.

In the present work, we hypothesized that the use of organic digestate and bacterial inoculum would increase the *Betula pendula* development by improving soil functioning in a red gypsum substrate. At the experimental site, the vegetation was dominated by the pioneer species *B. pendula* (Zapata-Carbonell et al., 2019). *B. pendula* is one of the most tolerant species to the high TE content of red gypsum substrate (Malabad et al., 2022). As reported by Dubois et al., (2020), birch also tolerates different climates and soil conditions; its great genetic variability supports its adaptability, and it has a positive effect on many soil properties. The aims of this work were therefore to i) determine the minimum digestate dose required to achieve a significant increase in birch biomass in a pot experiment and ii) evaluate the effect of combined digestate and bacterial inoculation on birch growth and leaf TE content, as well as on key enzyme indicators of soil function, in the laboratory or the field settings.

I.2. Materials and methods

I.2.1. Site description

The Ochsenfeld site is located in the commune of Thann in the north-east of France (lat. 47° 47' 47.6124" N - long. 7° 8' 18.6498" E). The Ochsenfeld site is an 80 ha area belonging to the world's largest TiO₂ producer, Tronox. It is used to store the by-products of TiO₂ extraction. The extraction of Ti by the sulphuric process led to the production of by-products: red gypsum, a solid residue enriched in Fe, S and Mn produced by the neutralisation and precipitation of the company's wastewater with limestone. As detailed elsewhere (Assad et al., 2017; Ciadamidaro et al., 2017; Zapata-Carbonell et al., 2019; Zappellini et al., 2018), the main characteristics of red gypsum were: 0.65% ± 1.48 organic matter, very low N content (0.005% ± 0.0006), 5.97% ± 0.11 C content, slightly alkaline pH (8.08 ± 0.36), and a cation exchange capacity of 26.8 ± 6.06 meq/kg. The chemical properties of the red gypsum included: 7.03 ± 0.12, 112.8 ± 3.4, 0.19 ± 0.05, and 0.03 ± 0.02 mg/kg for CaCl₂ extractable Mg, K, Mn and Zn respectively, and very low CaCl₂ extractable P and Cu (below the detection limit).

I.2.2. Plant material and growth in a laboratory setting

B. pendula seeds were collected from the study site in 2017 and sown directly on peat (Brill Typical, Germany). After germination, the seedlings were transferred to 77-cell seedling trays and pre-grown for three months under controlled conditions in a growth chamber. The climatic conditions were: 16 h at 23 °C, 8 h at 21 °C in the day/night regime, 70% average moisture, and about 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ photosynthetically active photons for the daylight intensity.

The first experiment conducted in the lab during 2017 was to optimise the digestate dose in order to determine the best minimum digestate concentration required for optimal birch development. Four concentrations were evaluated in 1 L pots containing 650 g of red gypsum collected from the Ochsenfeld site. The detailed composition and the agronomic characteristics, TE and organic compound contents of the raw digestate (Agrivalor[®], Hirsingue, France) used here are given in Table S1.

Pre-grown birch seedlings were transferred for 6 weeks to pots containing red gypsum amended with different amounts of raw digestate: zero (no digestate); 0.025% (40 ml), 0.05% (80 ml), 0.075% (120 ml) and 0.1% (160 ml) of N doses of raw digestate per pot, as recommended by the digestate provider (Agrivalor). The basis for determining the doses was the N content of the digestate studied, expressed as percentage of N (w/v) in the raw digestate. In the following, reference will be made to the abbreviations D0%, D0.025%, D0.05%, D0.075% and D0.1% for these different treatments, although we are well aware that digestate does not only provide N. The climatic conditions for the growth chamber experiment were the same as described above.

After selecting the optimal dose of digestate for birch growth, a second pot experiment was conducted in the lab to test the effect of digestate and bacterial inoculum on birch growth and physiological traits. The bacterial inoculum here consisted of a single *Pseudomonas* isolate previously isolated and characterized, which was chosen for its ability to promote plant growth and solubilize elements (Zappelini et al., 2018). Pre-grown birch seedlings were transferred to 1 L pots containing 700 g of red gypsum with four treatments as follows: optimal dose of digestate (D), the inoculum of *Pseudomonas* isolate (I), the combination of these previous treatments (D+I) and the unamended red gypsum used as a control treatment (C). For each treatment, 12 replicates were prepared. Birches were grown for six months in a lab setting (phytotronic chamber), in which the climatic conditions were similar to those described above.

I.2.3. Field experiment

A field experiment was set up for 16 months, based on eight plots of 1 m² each, randomly distributed over a dedicated area of the Ochsenfeld site. Sixteen pre-grown birch seedlings per plot were planted in May 2019. Two plots (I) were supplemented with bacterial inoculum in June 2019 and June 2020. On the same date, two additional plots (D) were amended with raw digestate using the optimal dose evaluated in the previous lab experiment. Then, two plots (D+I) received both treatments, *i.e.*, digestate and bacterial inoculum. There were two control plots (C) without digestate and bacteria. Given the results obtained in the pot experiment with an inoculum of a single isolate, and for greater efficiency, a consortium of five isolates including the one tested in the pot experiment constituted the inoculum used in the field experiment. These five bacterial isolates were previously characterized as *Arthrobacter sp.*, *Bacillus megaterium*, *Phyllobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* (as in the pot experiment), and *Variovorax sp.* These bacterial strains isolated from the Ochsenfeld site were selected for their ability to promote plant growth and/or solubilize elements (Zappellini et al., 2018). All bacterial strains used in this work were grown in 284-culture medium (Schlegel et al., 1991) at 25 °C on a rotary shaker at 150 rpm. Bacterial cultures (approximately 10⁸ CFU/mL) were harvested by centrifugation (10,000 rpm, 10 min) and suspended in sterile 10 mM MgSO₄ buffer to obtain the inoculum (10 mL per plant). The three experimental variants are presented in Table 1.

Table 1

Design of the experimental variants

Experiment	Setting	Duration	Treatment	Replicate	Parameters
1	Lab	6 weeks	Four concentrations of digestate (0.025% N, 0.05% N, 0.075% N, and 0.1% N)	n = 10	CCI, biomass, pH
2	Lab	6 months	Digestate (D0.05%) and bacterial inoculum (<i>Pseudomonas sp.</i>)	n = 12	Biomass, microbial enzyme activities, leaf TE content, pH, CaCl ₂ extractable Mn
3	Field	16 months	Digestate (D0.05%) and bacterial inoculum (<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> (as in the lab experiment 2), <i>Phyllobacterium sp.</i> , and <i>Variovorax sp.</i>)	n = 32	Biomass, leaf TE content, pH, CaCl ₂ extractable Mn

I.2.4. Plant and soil analyses

The relative chlorophyll content index (CCI) was estimated using a CCM-200 plus chlorophyll-metre (Opti-Sciences, Hudson, USA) based on absorbance measurements at 660 and 940 nm (Richardson et al., 2002) utilizing the third most developed leaf for each measurement to ensure consistency. At harvest, the following parameters were determined: shoot dry biomass (g/plant) and root dry biomass (g/plant) by drying the plant material in a forced air oven at 50 °C until a constant mass was obtained. As previously described by Assad et al., (2017), the total elemental content (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Zn) in the leaves (mg/kg DM) was determined using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP–AES, Radial ICAP 6500 Model, Thermo Fischer Scientific, Inc., Pittsburgh, USA) after milling and mineralization with HNO₃ and H₂O₂. The percent recoveries were between 79% and 102%.

The CaCl₂ Mn extractable was evaluated using a 0.01 M CaCl₂ extraction with a sample extraction ratio of 1:10 (Houba et al., 1996) by atomic absorption spectroscopy (AAS, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, US). The pH of the soil solution was measured in KCl according to the method of (Schofield and Taylor, 1955) using a pH metre (Model225 Denver Instrument Company, Colorado, US). 10 ± 0.2 g of substrate was placed in a 50 ml conical tube, and 25 ml of 1 M KCl solution was added to obtain a substrate/KCl ratio (m/v) of 2.5.

I.2.5. Soil and root enzyme activities analyses

Soils and roots from the second pot experiment were sampled and stored at 4 °C to determine microbial enzyme activities. Soil fractions were divided into bulk soil and rhizosphere soil, following the standardized sampling protocol detailed by (Barillot et al., 2013). To obtain the bulk soil, plants were shaken by hand for 10 min, to allow for complete sampling of soil particles not adhering to the roots. Rhizosphere soil, which correspond to the soil adhering to the root, was additionally sampled by shaking the roots for 10 min.

Sixteen microbial enzyme activities involved in the key steps of the C, N, P and S cycling were determined using fluorogenic substrates containing 4-methylumbelliferyl (MUF) or 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) as fluophores. Enzyme extracts were desorbed by a heteromolecular bead-beating exchange procedure according to Ferrarini et al., (2020). Briefly, 0.4 g of moist soil or 0.1 g of fresh thin roots were mixed with 1.4 ml of a solution containing

3% lysozyme, and glass and ceramic beads were placed in 2-mL tubes, shaken at 1,800 rpm for 3 min, and then centrifuged at $20,000 \times g$ for 5 min. The supernatant containing desorbed enzymes was dispensed into white 384-well microplates with appropriate buffers for fluorometric quantification of enzyme activities expressed as nmol of MUF or AMC/h/g SOM. The enzyme activities measured were as follows: (i) alpha-glucosidase (alfaG), beta-glucosidase (betaG), alpha-galactosidase (alfaGAL), beta-galactosidase (betaGAL), glucuronidase (uroni), and xylosidase (xilo) involved in C cycling; (ii) chitinase (chit), leucine-aminopeptidase (leu), and trypsin-like protease (trip) involved in N cycling; (iii) acid phosphomonoesterase (acP), alkaline phosphomonoesterase (alkP), phosphodiesterase (bisP), and pyrophosphate-phosphodiesterase (piroP) involved in P cycling; (iv) arylsulfatase (aryS) involved in S cycling; and (v) nonanoate-esterase (nona) and butyrate-esterase (butir) involved in the hydrolysis of ester bonds.

I.2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software version 4.0.4, the R Foundation for Statistical Computing (R Core Team, 2021). All tests were considered significant when $P < 0.05$. For all variables studied, normality was tested with the Shapiro–Wilk test, and homoscedasticity with the Bartlett test. Some data (birch biomass values in the field experiment and leaf TE content in the lab experiment) were log-transformed relative to the analysis of variance (ANOVA) postulates. For the preliminary experiment, the analysis included a two-way ANOVA, with the Tukey–Kramer test for differences in the means used for group classification. The ICP data were also analysed with ANOVA to compare the different treatments. Dataset that did not fit the ANOVA postulates, *i.e.*, nonparametric data (biomasses in the phytotronic chamber, microbial enzyme activities of roots and soil, CaCl_2 extractable Mn, pH values, and CCI) were investigated with a pairwise Kruskal–Wallis test to assess the difference among the treatments. Data were corrected for multiple comparisons using Bonferroni.

I.3. Results

I.3.1. Optimizing the digestate dose for *Betula pendula* growth improvement

A preliminary experiment was set up to determine the optimal dose of digestate for birch growth on red gypsum. Survival rates recorded after 6 weeks were found to be optimal at D0%, D0.025% and D0.05%, whereas the treatments D0.075% and D0.1% reduced survival rates by 20% and 40%, respectively. Addition of digestate as D0.025%, D0.05% and D0.075% to the red gypsum substrate increased birch height significantly compared to unamended pots, while the D0.1% treatment reduced height significantly compared to the other digestate treatments (Table 2). Overall, birch biomass was enhanced using digestate under the D0.025%, D0.05% and D0.075% treatments, although the effect was more pronounced at the root level. The shoot/root ratio was optimal under the D0.05% treatment in contrast to the D0.025% treatment.

Table 2

Birch survival rates, absolute growth, biomasses, and chlorophyll content index of birch leaves depending on digestate doses registered to harvest at six weeks (T_f) ($n=10$). Differences were determined by ANOVA and post hoc Tukey–Kramer test ($P < 0.05$). The groups formed are indicated by letters. Values represent the mean \pm the standard deviation of the mean. Abbreviations are as follows: C: control, D0.025%, D0.05%, D0.075%, D0.1% of N doses of raw digestate.

	C	D0.025%	D0.05%	D0.075%	D0.1%
Survival rates	100 %	100 %	100 %	80 %	60 %
Absolute growth (cm/week)	0.15 \pm 0.03 ^{bc}	0.75 \pm 0.13 ^a	0.45 \pm 0.11 ^{ab}	0.65 \pm 0.20 ^a	0.02 \pm 0.00 ^c
Shoot biomass (g)	0.80 \pm 0.12 ^{ab}	1.28 \pm 0.44 ^a	1.32 \pm 0.52 ^a	1.33 \pm 0.82 ^a	0.49 \pm 0.37 ^b
Root biomass (g)	1.60 \pm 0.46 ^{bc}	2.73 \pm 0.65 ^a	2.19 \pm 1.19 ^{ab}	1.71 \pm 1.21 ^{abc}	0.69 \pm 0.37 ^c
Shoot/Root ratio	0.54 \pm 0.17 ^{ab}	0.48 \pm 0.15 ^b	0.70 \pm 0.30 ^{ab}	0.79 \pm 0.34 ^a	0.76 \pm 0.32 ^a
Chlorophyll content index (arbitrary units)	4.57 \pm 0.91 ^c	5.37 \pm 1.83 ^{bc}	6.73 \pm 2.87 ^{bc}	7.89 \pm 2.67 ^{ab}	10.49 \pm 2.34 ^a

Additionally, the chlorophyll content analyses indicated significant differences ($P < 0.05$) between treatments, as it increased with increasing digestate concentrations. The addition of digestate did not alter the pH at the onset of the experiment, and only slight changes (decrease of < 0.2 pH unit under amendments) were observed at the end of the experiment. Overall, the treatment that combined the greatest increase in biomass production, the highest survival rate and the highest chlorophyll content (as an indicator of plant health) was D0.05%, which was selected for subsequent experiments.

I.3.2. Shoot and root biomasses of *Betula pendula* grown on red gypsum substrate

A second and third experiment were set up for 6 months in the laboratory and 16 months in the field. In addition to the digestate (D0.05%) treatment selected during the preliminary experiment, these experiments included a biofertilization treatment, which consisted of inoculating birch seedlings with bacteria isolated from a previous experiment (Zapellini et al., 2018). Both datasets obtained from the lab and field experiments are provided in the same figures below for easier visualization. However, direct comparisons between the two datasets were avoided because they were not carried out under the same experimental conditions, including different bacterial inocula and different experimental times.

At harvest, birch trees amended with digestate (D0.05%) produced significantly more shoot and root biomasses than the control treatment (C), in both the lab and field experiments (Fig. 1). The differences were greatest for birch, which was allowed to grow longer in the field experiment. In contrast, bacterial inoculum (I and D0.05%+I treatments compared to C and D0.05% controls, respectively) did not have any significant effect on birch biomass. As already observed in the preliminary experiment, digestate at D0.05% significantly increased the chlorophyll content of birch leaves in both lab and field experiments (Fig. S1).

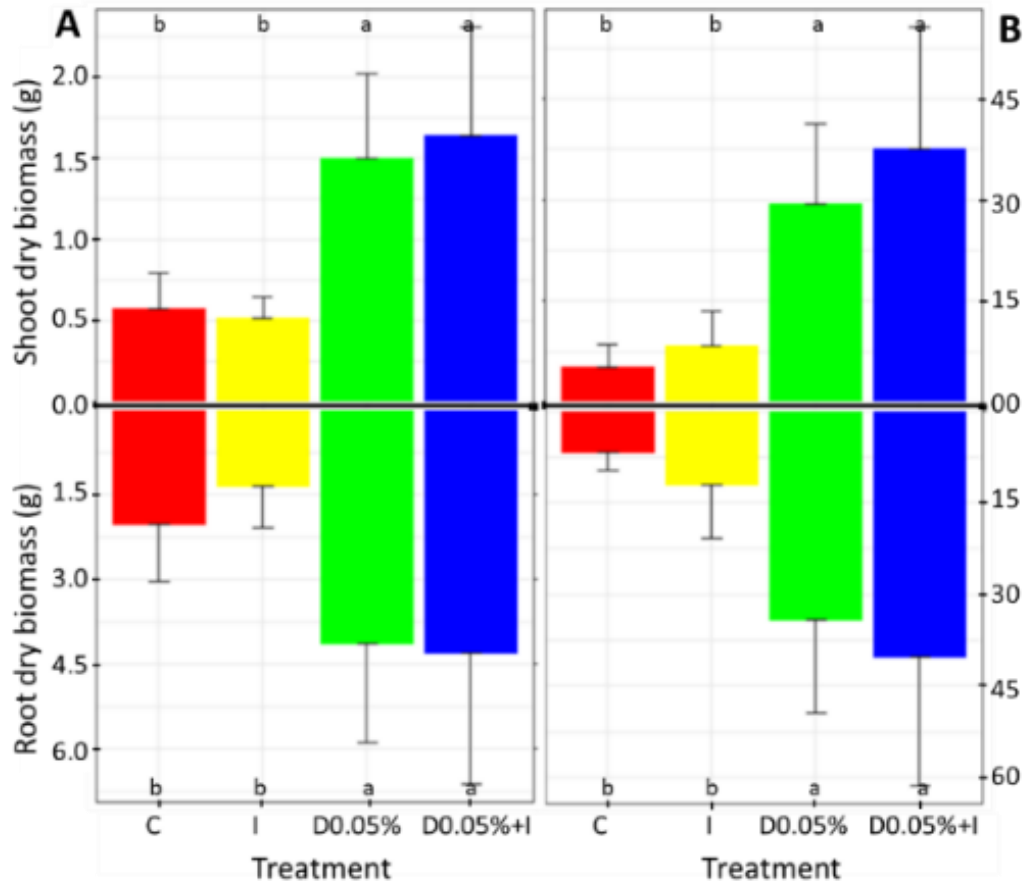


Fig. 1. Shoot and root dry biomasses of birch (values represent the mean and error bars represent the standard deviation of the mean.) A. in the lab experiment (n=12) and B. in the field experiment (n=32). Abbreviations are as follows: C: control, I: inoculum, D0.05%: digestate (0.05% of N), D0.05%+I: digestate (0.05% of N) + inoculum. The same letter did not differ significantly from each other using an ANOVA test ($P < 0.05$).

I.3.3. Leaf elemental content of *Betula pendula* grown on red gypsum substrate

The element (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S and Zn) content was measured in birch leaves under the various treatments for the lab and field experiments. Digestate added to the soil as an organic amendment in the laboratory significantly reduced Ca and Mn contents in birch leaves of treatments (D0.05%) and (D0.05%+I) compared to treatments (C) and (I), respectively (Figs. 2 and 3). In contrast, P and K contents increased significantly with digestate in the lab setting. In the field, similar trends were observed (Fig. 3), with an increase in K content and a decrease in Ca, Fe, Mn, S and Zn content in the digestate-amended plots compared to unamended plots.

The most significant change was observed for birch grown in the control field, which had 2-3-times higher Mn, Zn and Fe contents than birch grown in the amended field (Figs. 2 and 3). There was almost no effect of the bacterial inoculum on the leaf element contents, except i) an increase in K content in leaves of bacterially inoculated and amended lab-grown birches compared with uninoculated controls and ii) a decrease in Fe and Mn contents in the leaves of bacterial inoculated field-grown birches compared with the uninoculated control.

The leaf Mn content (expressed in mg/kg) of birches was *ca.* twice as high in control trees (with or without inoculum) as in trees amended with digestate in both lab and field experiments (Fig. 2 A and B). However, because digestate drastically enhanced the leaf production biomass, total leaf Mn (expressed as mg/plant) taken up by birches amended with digestate was more than twice that of control trees (Fig. 2 C and D).

In the field experiment, the Ca, Fe, S and Zn contents of leaves were significantly reduced by the digestate (Fig. 3). However, due to the biomass of birch trees (Fig. 1), the total content of all these elements was higher compared to the control birch trees, following a similar trend as for Mn. Leaf Cu and P content showed no differences among treatments. In contrast, leaf K content in the field and lab experiment was twice as high with digestate treatment, showing the potential for this element to accumulate by increasing biomass. In the lab experiment, because the growth conditions were less representative of field conditions, and leaf biomass production was an order of magnitude lower than in the field experiments, except for Ca, the content of all other elements, *i.e.*, Cu, Fe, Mg, S and Zn, were not impacted by the digestate (Fig. 3).

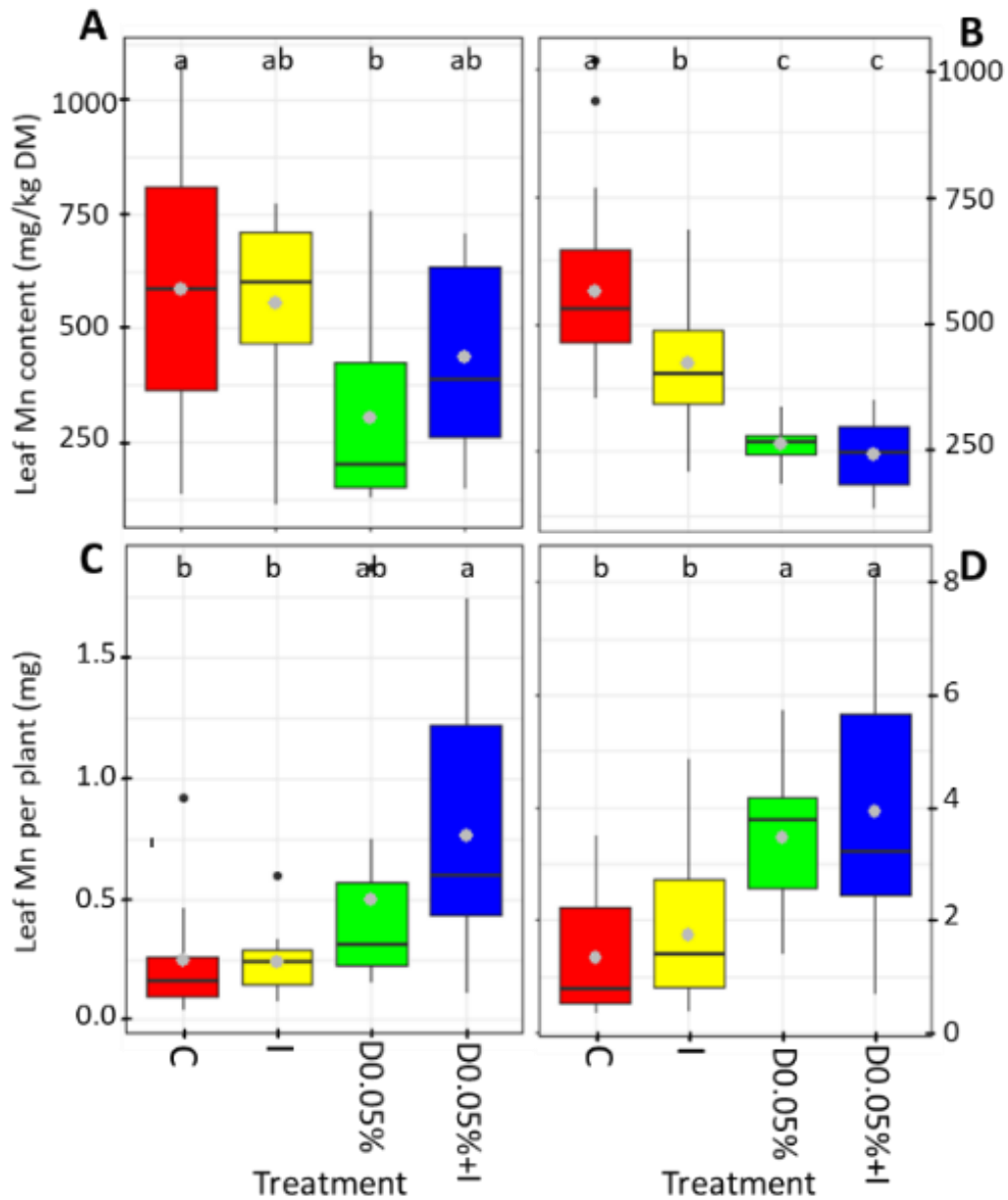


Fig. 2. Leaf Mn content expressed as mg/kg DM or mg/plant (mean (grey dot), median, quartiles, range, and outliers) (n=12). A. C. in the lab experiment and B. D. in the field experiment. Colour red corresponds to C: control, yellow to I: inoculum, green to D0.05%: digestate (0.05% of N), and blue to D0.05%+I: digestate (0.05% of N) + inoculum. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other using an ANOVA test ($P < 0.05$).

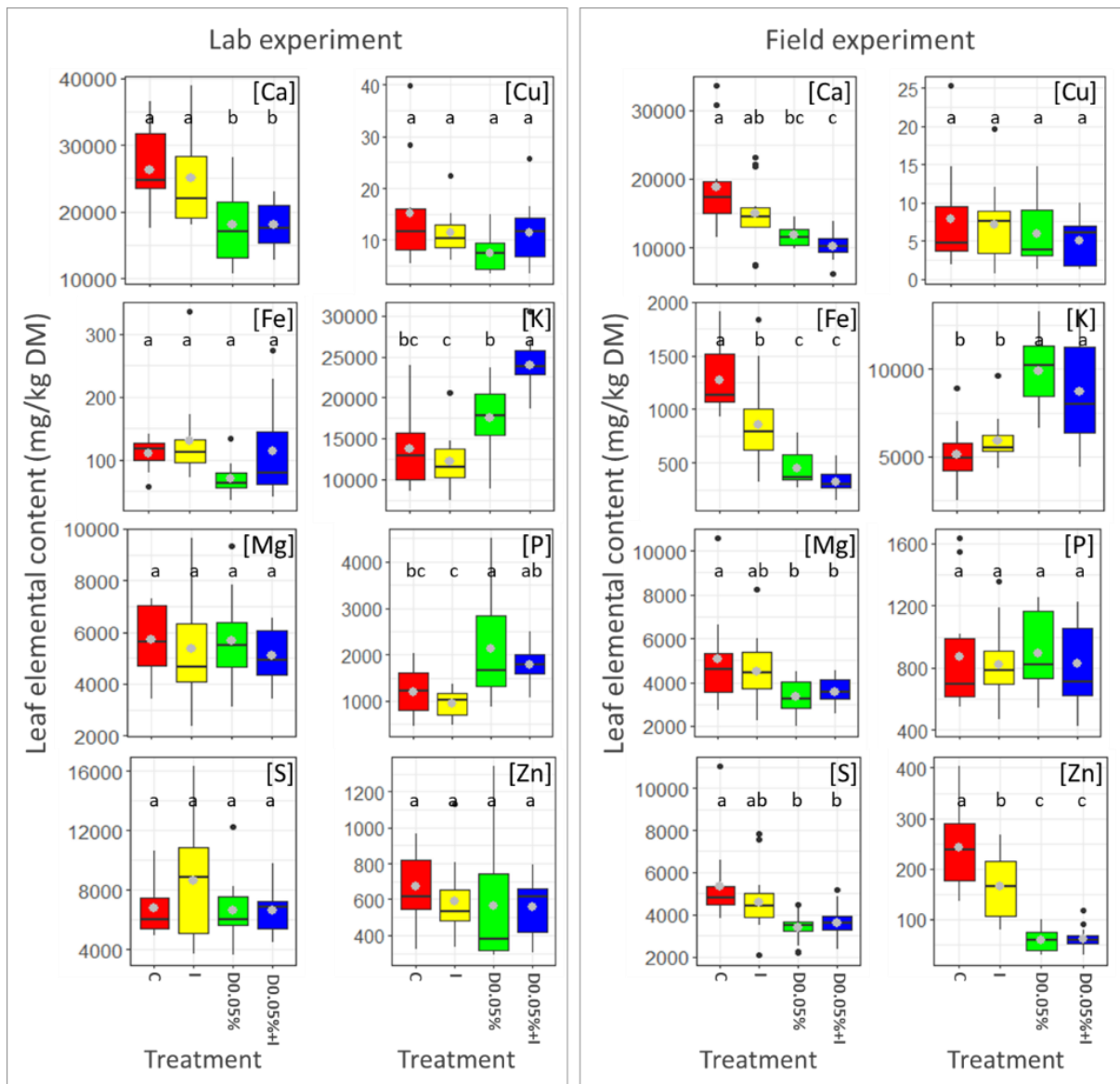


Fig. 3. Leaf elemental content expressed as mg/kg DM (mean (grey dot), median, quartiles, range, and outliers) (n = 12) measured in leaves of the birch seedlings grown in the lab and the field. Abbreviations are as follows: C: control, I: inoculum, D0.05%: digestate (0.05% of N), D0.05%+I: digestate (0.05% of N) + inoculum. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other using ANOVA ($P < 0.05$).

I.3.4. Microbial enzyme activities in soils and roots of *Betula pendula* from the lab experiment

Sixteen microbial enzyme activities, which are involved in key steps of C, N, P and S cycling, were measured in root and soil samples of the second lab experiment.

In roots, the digestate amendment significantly increased the activities of microbial enzymes related to the N cycling (trip, leu and chit) by more than 2-fold compared with the control (Fig. 4). Conversely, digestate induced a significant decrease in the activity of P cycling enzymes (bisP, piroB, and alkP), except for acP, for which there were no significant difference between treatments. Some C-related enzymes (alfaGAL, betaGAL and uroni) also decreased significantly in roots of the digestate-treated soil. The bacterial inoculum had almost no significant impact on microbial enzyme activities, except for the aryS values, which were two times lower than those in control birch roots.

We then compared the set of microbial enzyme activities in bulk and rhizosphere soils. As observed for root activities, the digestate amendment significantly increased enzyme activities related to N cycling (trip, leu and chit) by more than 2-3-fold compared to the control (Fig. 5). In contrast to the root dataset, digestate induced significant increases in the activities of the P cycling enzyme acP, of most of the C-linked enzymes (alfaG, betaG, alfaGal, betaGal, uroni and xilo) and enzymes involved in the hydrolysis of ester bonds (Fig. 5). The enzyme activities related to P (alkP, bisP and piroB) that decreased in the roots did not show significant changes in soils.

Bacterial inoculum had almost no significant impact on microbial enzyme activities measured in roots (Fig. 4) or bulk soils (Fig. 5), except for the aryS values, which were two times lower than those in control birch roots. In contrast, the bacterial inoculum had significant effects on rhizosphere soils, enhancing the effect of digestate on enzyme activities related to the S cycling (aryS), N cycling (chit, leu, trip), C cycling (alfaG, betaG, alfaGAL, betaGAL, uroni, xilo) and P cycling (acP and alkP).

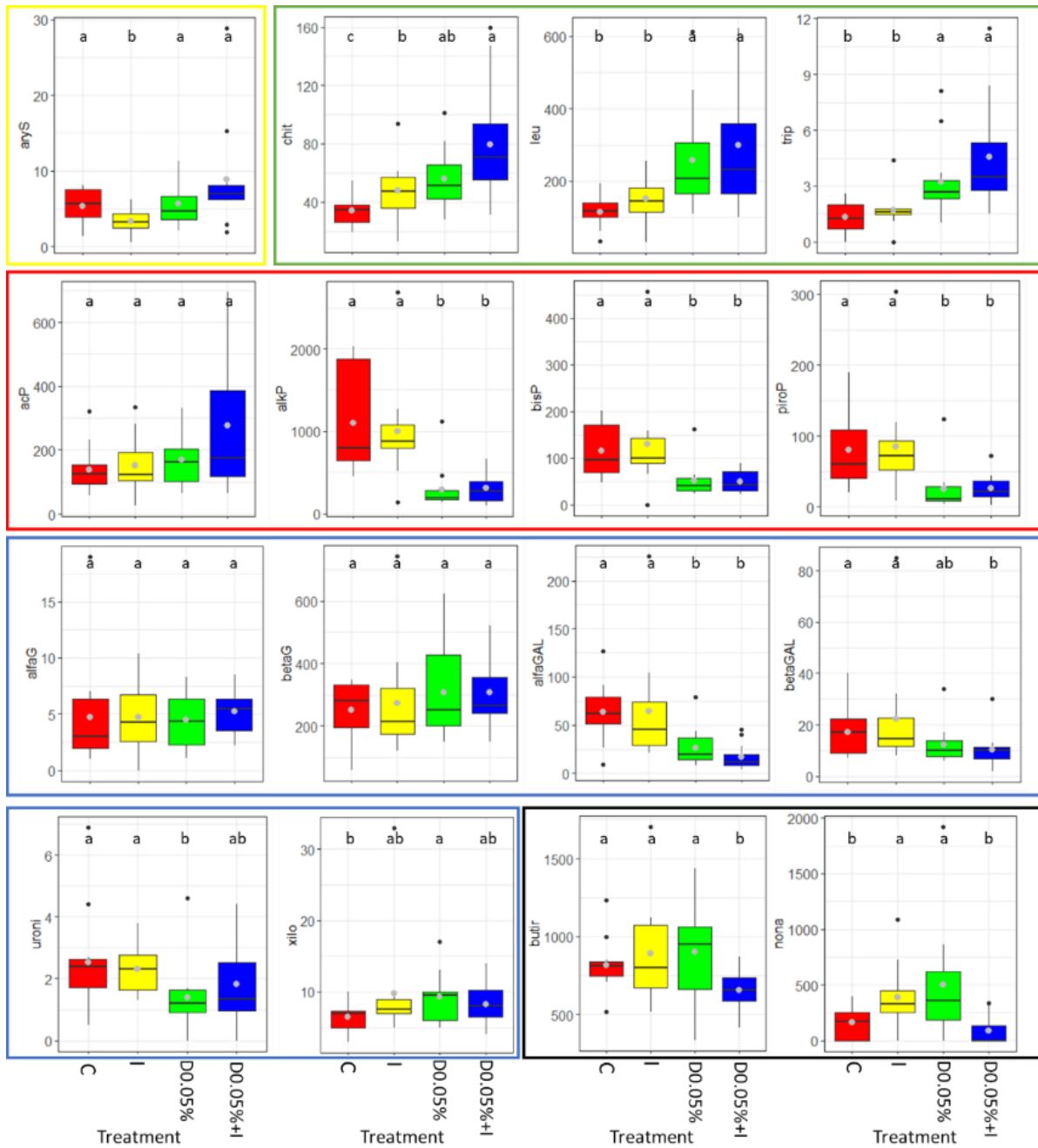


Fig. 4. Microbial enzyme activities in *B. pendula* roots (mean (grey dot), median, quartiles, range, and outliers) expressed as nmol of MUF (or AMC)/g of soil (dry basis)/hour in the lab experiment (n=12). Colour red corresponds to C: control, yellow to I: inoculum, green to D0.05%: digestat (0.05% of N), and blue to D0.05%+I: digestate (0.05% of N) +inoculum. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$). The enzyme activities involved in the S cycling are bordered in yellow, in the N cycling in green, in the P cycling in red, in the C cycling in blue, and in the hydrolysis of ester bonds in black.

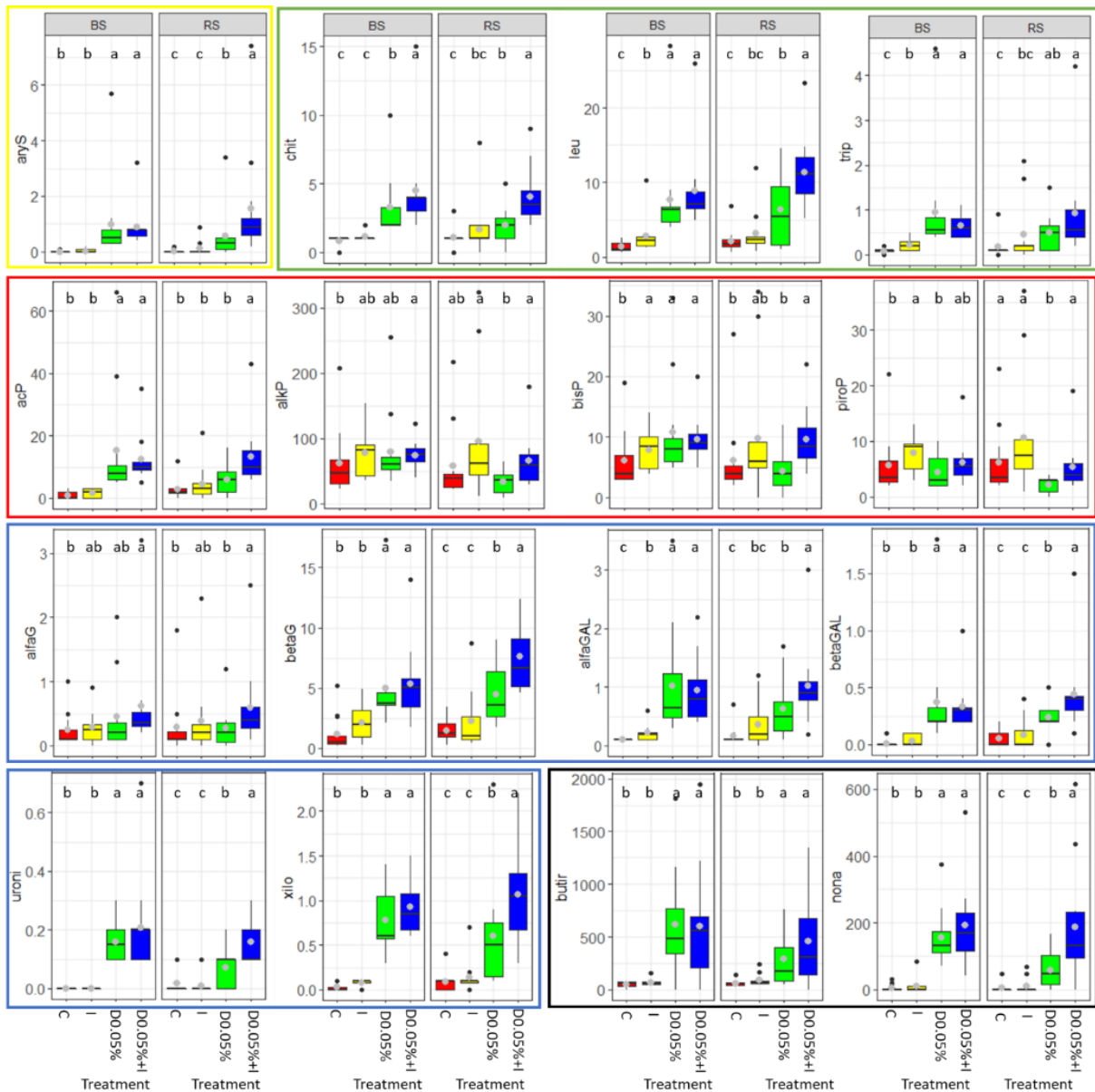


Fig. 5. Microbial enzyme activities of bulk (BS) and rhizosphere soil (RS) (mean (grey dot), median, quartiles, range, and outliers) expressed as nmol of MUF (or AMC)/g of soil (dry basis)/hour in the lab experiment (n=12). Colour red corresponds to C: Control, yellow to I: inoculum, green to D0.05%: digestate (0.05% of N), and blue to D0.05%+I: digestate (0.05% of N) + inoculum. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$). The enzyme activities involved in the S cycling are bordered in yellow, in the N cycling in green, in the P cycling in red, in the C cycling in blue, and in the hydrolysis of ester bonds in black.

I.4. Discussion

I.4.1. An optimal digestate dose for increased *Betula pendula* biomass was designed

The lack of nutrients (especially N) or their low biological availability on a red gypsum site makes these areas highly unfavourable for plant growth (Zapata-Carbonell et al., 2019). Soil fertility and productivity can be enhanced by organic amendments to improve the plant nutrient status and potentially limit nutrients such as N, P and K (Liu et al., 2009). Here, we showed that birch biomass production could be efficiently enhanced using digestate in both lab and field experiments. The simple presence of essential nutrients in digestate can explain the differences in biomass production between digestate treatments, and a digestate dose corresponding to 0.05% of N appeared to be optimal for birch growth. The chlorophyll content for the D0.05% and D0.075% treatments recorded the highest values in a lab experiment, but it is worth mentioning that leaf size and chlorosis were influencing factors that hampered data collection, especially for the D0.1% N treatment, which provided no data. An excess of digestate (0.075 to 0.1% N) could have adverse effects on *B. pendula*, as evidenced by higher mortality rates and reduced biomass for the 0.1% treatment. This could be due to the presence of ammonium (Möller and Müller, 2012), which can damage chloroplast structure, disrupt photosynthesis, cause oxidative stress, and deplete carbon supply (Bittsánszky et al., 2015); the latter may also be warranted given the low C:N ratio of the digestate. Therefore, digestate amendment should be used more cautiously due to environmental pollution risks such as potentially higher emission of NH₃, and higher concentration of TE (Zn and Mn) which could induce toxic side effects in soils and ultimately impact plant growth and survival (Karimi et al., 2022; Nkoa, 2014).

In the field experiment, the digestate applied twice at D0.05% N showed a significant effect on birch growth. To our knowledge, no studies have been conducted on the ability of digestate to increase woody biomass yield on contaminated substrates. However, various studies have reported that digestate generally increases yield and biomass of plants, such as wheat on pasture soil intermittently in pot experiments (Abubaker et al., 2012), watermelon on Typic Xerofluvent soil in field assays (Albuquerque et al., 2012), spring barley on an Orthic Luvisol field (Barlóg et al., 2019), and corn in field experiments on a soil classified as a typical Luvisol (Przygocka-Cyna and Grzebisz, 2018). Due to its high content of nutrients (N, P, and

K) in available form, the digestate with its relevant fertilizing properties could clearly replace inorganic fertilizers (Šimon et al., 2015; Tambone et al., 2010). Therefore, agricultural biogas plants are relevant candidates to treat organic residues while facilitating the future development of the agricultural economy (Pognani et al., 2009).

I.4.2. Effect of bacterial inoculum on *Betula pendula* growth

As suggested in the literature, the presence of microbial communities is necessary for the efficient establishment of vegetation. Therefore, given the harsh conditions of red gypsum, inoculation of bacteria isolated from plants growing on the site could be a relevant strategy to improve plant growth. In the present work, an inoculum was built with bacteria that had been previously isolated from the site and exhibited certain PGPR traits (Zappellini et al., 2018); thus, this inoculum was likely to promote plant growth, especially by acting on plant nutrition via different mechanisms (Lugtenberg and Kamilova, 2009). In our present study, the bacterial inoculum did not improve birch growth in the lab experiment (with the single isolate of *Pseudomonas*), and in the field experiment (with a consortium of five bacterial isolates). However, it has been shown (Molina-Romero et al., 2021) that plant colonization by a bacterial consortium (*Azospirillum brasilense* Sp7, *Pseudomonas putida* KT2440, *Acinetobacter* sp. EMM02, and *Sphingomonas* sp. OF178A) was more effective than with colonization by a single bacterium. As reported by Moradtalab et al., (2020), the ability of bacteria to colonize roots was related to their ability to stimulate plant growth. The bacterial consortium could increase nutrient availability in the rhizosphere, which would explain the higher biomass production in roots and leaves (Nadeau et al., 2018). The bacterial inoculum composed of bacterial consortium would provide a greater diversity, which is known to have a beneficial effect on soil productivity, such as suppressing diseases (Garbeva et al., 2004) or potentially improving their resilience to disturbance (Naeem and Li, 1997). Although not the case in our study, it was demonstrated in a previous study (Sapp et al., 2015), bacterial diversity was slightly higher in soils amended with digestate than in the untreated control from the beginning to the end of the experiment. Thus, digestate that contained native bacteria and nutrients may allow for easier colonization by exogenous bacteria.

I.4.3. Digestate increased P, K and decreased Ca, Fe, Mn, Zn in *Betula pendula* leaves

The digestate had a significant impact on leaf element contents. In the lab experiment, it increased leaf P and K nutrients and decreased leaf Ca, Fe and Mn content. The same phenomenon was observed in the field, except for K, which did not vary between treatments, and for leaf Zn content, which decreased with digestate. This negative relationship between P and K contents and Ca, Fe, and Mn was also observed in *Petunia* plants on a peat substrate amended with digestate in a greenhouse experiment (Dubský et al., 2019). The authors of this study explained that the decrease in element content in plants could be due to the soil pH, which increased with digestate treatment, resulting in a reduction in element availability in the soil. A similar beneficial effect of the digestate on reducing soil acidity has been observed, but in previous studies (Piątek and Bartkowiak, 2019; Różyło et al., 2015), the initial pH was mostly in the acidic range (<5). In contrast, in the present study with a higher initial pH, digestate treatment did not increase but rather decreased pH in the lab experiment (Fig. S2), which would normally be expected to increase TE availability and thus the transfer to the leaf compartment. A similar decrease in soil pH upon digestate application has also been observed in a previous experiment, which had only a minor effect on element content in plants (Dragicevic et al., 2018). In our study, the higher leaf content of P would be related to the higher total P concentrations in the digestate (Table S1) compared to the substrate (Assad et al., 2017). According to Marschner, (2011), increased plant growth and vigour under the influence of a better N supply, as in the case of digestate treatment, may explain the increase in P and K. Antagonistic effects of K and P on Ca and Fe accumulation by a number of plants grown on red gypsum have also been evidenced (Assad et al., 2017). Antagonisms between P and Mn (Pedas et al., 2011), P and Ca (Jakobsen, 1993), and P and Zn (Sacristán et al., 2019) have also been observed in other studies.

Detailed study of the relationship between treatment-induced biomass increases and element accumulation shows that, except for K, birch biomass increase with amendment was, in most cases, antagonistic to an enrichment of biomass in the elements. Indeed, we observed in this study that all treatments that stimulated growth decreased the ratio of TE to leaf biomass. In the context of a phytomanagement strategy for marginal land cover, these results are particularly interesting, suggesting that the production of birch biomass with low leaf element content could be a possibility in such a landfill; however, attempting to enrich this biomass for

an interested element would likely be an antagonist to promote tree growth. However, it is necessary to determine the stem TE content in order to get a complete picture of the amount of the TE accumulation by the harvested birches.

I.4.4. Digestate improved the soil microbial enzyme activities

Fertilization with digestate had a clear positive impact on the rhizosphere microbiome. There was an overall increase in some key soil enzyme activities, demonstrating an improvement in microbial N, S and C metabolism. The microbial biomass measured by means of dsDNA determination could have given us clues on the values recorded for the enzyme activities. Despite our efforts, no dsDNA could be recovered from the red gypsum substrate, which might be due to the excess iron oxide complexes that bind the organic compounds necessary to achieve DNA extraction. The methods used without success were PicoGreen (Life Technologies) quantification of crude dsDNA extracts, chloroform fumigation-extraction, and DNA extraction commercial kits: DNeasy® PowerSoil® Pro Kit - DNA isolation (QIAGEN SAS, Courtaboeuf, France) and PowerMax® Soil and PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO laboratories Inc., Carlsbad, CA USA).

Soil alfaG, betaG, alfaGAL, and betaGAL activities all increased in the digestate treatments, consistent with results from crops receiving organic fertilizers (Zhang et al., 2015). The increase in enzyme activities likely reflects the higher soil carbon turnover rates in the red gypsum substrate that received digestate, as soil alfaG, betaG, alfaGAL and betaGAL are involved in the hydrolysis of soil maltose, cellobiose, melibiose, and lactose, respectively. Increased enzyme activities also included xilo, produced by endophytic bacteria and fungi, which hydrolyses xylans, the main components of lignified organic matter, along with cellulose and lignin. These findings are also consistent with recent findings on the effect of biofertilizers on wheat (Dal Cortivo et al., 2020). Nona and butir activities, which are involved in the hydrolysis of ester bonds, were significantly increased by digestate treatment. The activities of chit, leu, and trip, which reflect N transformations, were also significantly enhanced by digestate application. In a previous study, as chit activity was greatly enhanced by biogas digestate, the authors suggested that it was promoted by N-enriched organic components of peptidoglycan accumulated as microbial residues during biogas fermentation (Chen et al., 2012). Protease activity was shown to be enhanced in soils fertilized with biogas digestate, and

the authors suggested that biogas digestate could be used in agricultural practice to improve the subsoil microbial activity (Różyło and Bohacz, 2020).

Some of the measured microbial enzyme activities were much higher in the root samples, which can be interpreted by enzyme release from the roots or by lysis of root cells or by endophytic microorganisms living in the root tissues. With the exception of alkP, which is produced exclusively by microorganisms (Spohn and Kuzyakov, 2013), most of the enzymes measured may indeed be produced by plants. However, the effect of digestate was almost unnoticed in most samples, with the activities of alkP, alfaGal, betaGal, and uroni decreasing strongly under digestate treatment. This likely reflects the strong competition for C substrates in the rhizosphere between plants and microbes (Jones et al., 2018). Stimulation of microbial communities by digestate promotes the production of microbial-related enzymes.

I.5. Conclusions

The dataset obtained within the present work demonstrates that the use of organic digestate and bacterial inoculum increased the development of *Betula pendula* on a red gypsum substrate by improving soil functionalities. The 0.05% N digestate dose resulted in significant improvements in plant development without showing phytotoxic effects on the leaf and root biomass. The presence of digestate in the soil allowed for an increase in the intensity of biomass production without increasing the intensity of TE accumulation (Cu, Fe, Mn and Zn notably), which resulted in a decrease in the content of TE in birch leaves through a dilution effect. The digestate also affected the functions of the soil microbiome, particularly the enzyme activities involved in C, N, P, and S cycling. The bacterial inoculum had no significant effect on either plant growth or leaf TE content. Therefore, an appropriate dose of digestate could be proposed as an efficient strategy for the revegetation of landfills in a phytomanagement approach.

CRedit authorship contribution statement

Abdoulaye Mahamat Malabad: Investigation, Conceptualization, Visualization, Writing – original draft. **José Zapata-Carbonell:** Investigation, Conceptualization, Writing – original draft. **Nicolas Maurice:** Investigation, Writing – original draft. **Lisa Ciadamidaro:** Conceptualization, Writing – original draft. **Stéphane Pfendler:** Conceptualization, Writing – original draft. **Fabienne Tatin-Froux:** Investigation, Conceptualization, Writing – original draft. **Andrea Ferrarini:** Investigation, Writing – original draft. **Flavio Fornasier:** Investigation, Writing – original draft. **Marie-Laure Toussaint:** Investigation, Writing – original draft. **Julien Parelle:** Investigation, Conceptualization, Visualization, Writing – original draft. **Michel Chalot:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. Nadia Morin-Crini, and Caroline Amiot of the PEAT² platform for ICP analyses. We thank Jean-Michel Colin (Tronox, France) for providing us with access to the Ochsenfeld site and red gypsum substrate and Noël Adam (Agrivalor, France) for providing us with digestate. This work was supported by the French National Research Agency [PHYTOCHEM ANR-13-CDII-0005-01] and the French Environment and Energy Management Agency [PROLIPHYT ADEME- 1172C0053].

Supplementary material

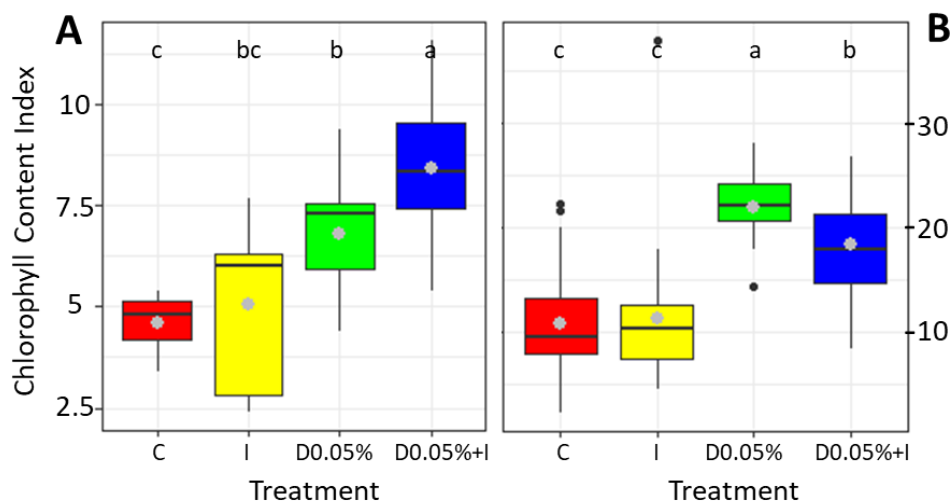


Fig. S1. Chlorophyll content index of birch leaves (mean (grey dot), median, quartiles, range, and outliers) grown A. in the lab experiment (n=12) and B. in the field experiment (n=32). Abbreviations are as follows: C: control, I: inoculum, D: digestate, DI: digestate+inoculum. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

Table S1.

Measured parameters of digestate. Determined by Agrivalor®

	pH	Total N (% DM)	NH ₄ (% DM)	OM (% DM)	Organic C (% DM)	C/N	P ₂ O ₅ (% DM)
Mean	8.43	0.82	0.31	5.09	2.88	3.5	0.26
± SD	± 0.1	± 0.1	± 0.03	± 0.19	± 0.14	± 0.2	± 0.01
	S (mg/kg DM)	Cd (mg/kg DM)	Cr (mg/kg DM)	Fe (mg/kg DM)	Pb (mg/kg DM)	Zn (mg/kg DM)	Mn (mg/kg DM)
Mean	0.11	0.20	17.20	5627	3.73	187	356 ±
± SD	± 0.02	± 0.02	± 2.80	± 252	± 0.78	± 14	23

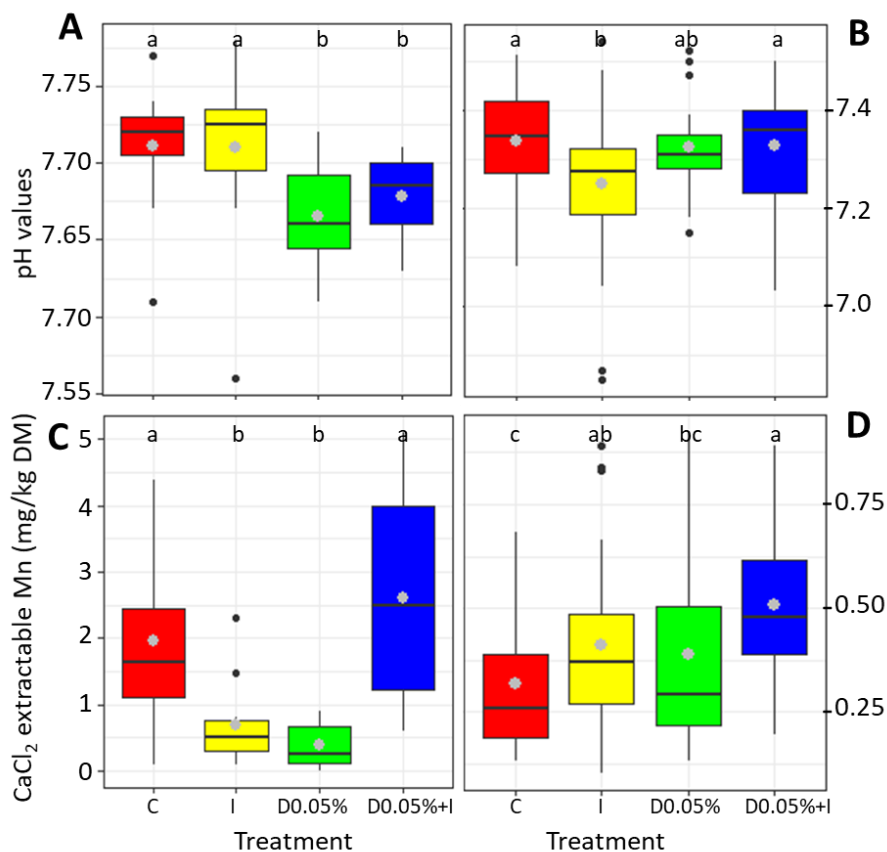


Fig. S2. pH values and CaCl₂ extractable Mn (mg/kg DM) (mean (grey dot), median, quartiles, range, and outliers) A. C. in the lab experiment (n=12) and B. D. in the field experiment (n=32). Abbreviations are as follows: C: control, I: inoculum, D: digestate, DI: digestate+inoculum. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

References

- Abubaker, J., Risberg, K., Pell, M., 2012. Biogas residues as fertilisers – Effects on wheat growth and soil microbial activities. *Appl. Energy* 99, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.04.050>
- Albuquerque, J.A., de la Fuente, C., Campoy, M., Carrasco, L., Nájera, I., Baixauli, C., Caravaca, F., Roldán, A., Cegarra, J., Bernal, M.P., 2012. Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. *Eur. J. Agron.* 43, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.06.001>
- Assad, M., Tatin-Froux, F., Blaudez, D., Chalot, M., Parelle, J., 2017. Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 5019–5031. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8242-4>
- Barillot, C.D.C., Sarde, C.-O., Bert, V., Tarnaud, E., Cochet, N., 2012. A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Ann. Microbiol.* 63, 471–476. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0491-y>

- Barlóg, P., Hlisnikovský, L., Kunzová, E., 2019. Yield, content and nutrient uptake by winter wheat and spring barley in response to applications of digestate, cattle slurry and NPK mineral fertilizers. *Arch. Agron. Soil Sci.* 66, 1481–1496. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1676890>
- Bittsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., Komives, T., 2015. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Sci.* 231, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.005>
- Bradshaw, A., 1997. Restoration of mined lands—using natural processes. *Ecol. Eng.* 8, 255–269. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(97\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(97)00022-0)
- Chapin, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P.M., 2011. Landscape Heterogeneity and Ecosystem Dynamics, in: Chapin, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P.M. (Eds.), *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. Springer, New York, NY, pp. 369–397. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9504-9_13
- Chen, L., Luo, S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., Wan, Y., Li, B., Xu, T., Xi, Q., Rao, C., Liu, C., Zeng, G., 2010. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Appl. Soil Ecol.* 46, 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.003>
- Chen, R., Blagodatskaya, E., Senbayram, M., Blagodatsky, S., Myachina, O., Dittert, K., Kuzyakov, Y., 2012. Decomposition of biogas residues in soil and their effects on microbial growth kinetics and enzyme activities. *Biomass Bioenergy* 45, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.014>
- Dal Cortivo, C., Ferrari, M., Visioli, G., Lauro, M., Fornasier, F., Barion, G., Panozzo, A., Vamerali, T., 2020. Effects of Seed-Applied Biofertilizers on Rhizosphere Biodiversity and Growth of Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Field. *Front. Plant Sci.* 11.
- Do, T.C.V., Scherer, H.W., 2012. Compost and biogas residues as basic materials for potting substrates. *Plant Soil Environ.* 58, 459–464.
- Dragicevic, I., Sogn, T.A., Eich-Greatorex, S., 2018. Recycling of Biogas Digestates in Crop Production—Soil and Plant Trace Metal Content and Variability. *Front. Sustain. Food Syst.* 2.
- Dubois, H., Verkasalo, E., Claessens, H., 2020. Potential of Birch (*Betula pendula* Roth and *B. pubescens* Ehrh.) for Forestry and Forest-Based Industry Sector within the Changing Climatic and Socio-Economic Context of Western Europe. *Forests* 11, 336. <https://doi.org/10.3390/f11030336>
- Dubský, M., Chaloupková, Š., Kaplan, L., Vondráčková, S., Tlustoš, P., 2019. Use of solid phase of digestate for production of growing horticultural substrates. *Hortic. Sci.* 46 (2019), 34–42. <https://doi.org/10.17221/221/2016-HORTSCI>
- Ferrarini, A., Martani, E., Fornasier, F., Amaducci, S., 2020. High C input by perennial energy crops boosts belowground functioning and increases soil organic P content. *Agric. Ecosyst. Environ.* 308, 107247. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107247>
- Garbeva, P., van Veen, J. a., van Elsas, J. d., 2004. MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 243–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Gielnik, A., Pechaud, Y., Huguenot, D., Cébron, A., Riou, J.-M., Guibaud, G., Esposito, G., van Hullebusch, E.D., 2019. Effect of digestate application on microbial respiration and bacterial communities' diversity during bioremediation of weathered petroleum hydrocarbons contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 670, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.176>
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Elsas, J.D. van, 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>

- Houba, V.J.G., Lexmond, Th.M., Novozamsky, I., van der Lee, J.J., 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci. Total Environ.* 178, 21–28. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04793-X](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04793-X)
- Jakobsen, S.T., 1993. Interaction between Plant Nutrients: IV. Interaction between Calcium and Phosphate. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* 43, 6–10. <https://doi.org/10.1080/09064719309410224>
- Jia, Y., Nason, P., Maurice, C., Alakangas, L., Öhlander, B., 2015. Investigation of biosolids degradation under flooded environments for use in underwater cover designs for mine tailing remediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 10047–10057. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4131-5>
- Jing, Y., He, Z., Yang, X., 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8, 192–207. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0192>
- Jones, D.L., Magthab, E.A., Gleeson, D.B., Hill, P.W., Sánchez-Rodríguez, A.R., Roberts, P., Ge, T., Murphy, D.V., 2018. Microbial competition for nitrogen and carbon is as intense in the subsoil as in the topsoil. *Soil Biol. Biochem.* 117, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.024>
- Karimi, B., Sadet-Bourgeteau, S., Cannavacciuolo, M., Chauvin, C., Flamin, C., Haumont, A., Jean-Baptiste, V., Reibel, A., Vrignaud, G., Ranjard, L., 2022. Impact of biogas digestates on soil microbiota in agriculture: a review. *Environ. Chem. Lett.* <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01451-8>
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6, 1244–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x>
- Liu, M., Hu, F., Chen, X., Huang, Q., Jiao, J., Zhang, B., Li, H., 2009. Organic amendments with reduced chemical fertilizer promote soil microbial development and nutrient availability in a subtropical paddy field: The influence of quantity, type and application time of organic amendments. *Appl. Soil Ecol.* 42, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.03.006>
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M., Lelie, D. van der, 2002. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 583–606. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044377>
- Lošák, T., Musilová, L., Zatloukalová, A., Szostková, M., Hlušek, J., Fryč, J., Vítěz, T., Haitl, M., von Bennewitz, E., Martensson, A., 2012. Digestate is equal or a better alternative to mineral fertilization of kohlrabi. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.* 60, 91–96. <https://doi.org/10.11118/actaun201260010091>
- Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Makádi, M., Tomócsik, A., Orosz, V., 2012. Digestate: A New Nutrient Source - Review. pp. 295–310. <https://doi.org/10.5772/31355>
- Malabad, A.M., Tatin-Froux, F., Gallinet, G., Colin, J.-M., Chalot, M., Parelle, J., 2022. A combined approach utilizing UAV 3D imaging methods, in-situ measurements, and laboratory experiments to assess water evaporation and trace element uptake by tree species growing in a red gypsum landfill. *J. Hazard. Mater.* 425, 127977. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127977>
- Marschner, H., 2011. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press.
- Molina-Romero, D., Juárez-Sánchez, S., Venegas, B., Ortíz-González, C.S., Baez, A., Morales-García, Y.E., Muñoz-Rojas, J., 2021. A Bacterial Consortium Interacts With Different Varieties of Maize, Promotes the Plant Growth, and Reduces the Application of Chemical Fertilizer Under Field Conditions. *Front. Sustain. Food Syst.* 4, 293. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.616757>

- Möller, K., Müller, T., 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Eng. Life Sci.* 12, 242–257. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100085>
- Moradtalab, N., Ahmed, A., Geistlinger, J., Walker, F., Höglinger, B., Ludewig, U., Neumann, G., 2020. Synergisms of Microbial Consortia, N Forms, and Micronutrients Alleviate Oxidative Damage and Stimulate Hormonal Cold Stress Adaptations in Maize. *Front. Plant Sci.* 11, 396. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00396>
- Nadeau, M.B., Laur, J., Khasa, D.P., 2018. Mycorrhizae and Rhizobacteria on Precambrian Rocky Gold Mine Tailings: II. Mine-Adapted Symbionts Alleviate Soil Element Imbalance for a Better Nutritional Status of White Spruce Seedlings. *Front. Plant Sci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01268>
- Naeem, S., Li, S., 1997. Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature* 390, 507–509. <https://doi.org/10.1038/37348>
- Nkoa, R., 2014. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 473–492. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0196-z>
- Pedas, P., Husted, S., Skytte, K., Schjoerring, J., 2011. Elevated phosphorus impedes manganese acquisition by barley plants. *Front. Plant Sci.* 2.
- Piątek, M., Bartkowiak, A., 2019. Assessment of selected physicochemical properties of soil fertilized with digestate. *Woda Śr. Obsz. Wiej.* 19, 55–66.
- Pognani, M., D'Imporzano, G., Scaglia, B., Adani, F., 2009. Substituting energy crops with organic fraction of municipal solid waste for biogas production at farm level: A full-scale plant study. *Process Biochem.* 44, 817–821. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.03.014>
- Przygocka-Cyna, K., Grzebisz, W., 2018. Biogas digestate – benefits and risks for soil fertility and crop quality – an evaluation of grain maize response. *Open Chem.* 16, 258–271. <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0027>
- R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Richardson, A.D., Duigan, S.P., Berlyn, G.P., 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytol.* 153, 185–194. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x>
- Różyło, K., Bohacz, J., 2020. Microbial and enzyme analysis of soil after the agricultural utilization of biogas digestate and mineral mining waste. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 17, 1051–1062. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02522-0>
- Różyło, K., Oleszczuk, P., Joško, I., Kraska, P., Kwiecińska-Poppe, E., Andruszczak, S., 2015. An ecotoxicological evaluation of soil fertilized with biogas residues or mining waste. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3927-z>
- Sacristán, D., González-Guzmán, A., Barrón, V., Torrent, J., Del Campillo, M.C., 2019. Phosphorus-induced zinc deficiency in wheat pot-grown on noncalcareous and calcareous soils of different properties. *Arch. Agron. Soil Sci.* 65, 208–223. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1492714>
- Sandell Festin, E., Salk, C., Tigabu, M., Syampungani, S., Christer Odén, P., 2019. Biological traits of tropical trees suitable for restoration of copper-polluted lands. *Ecol. Eng.* 138, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.07.010>

- Sapp, M., Harrison, M., Hany, U., Charlton, A., Thwaites, R., 2015. Comparing the effect of digestate and chemical fertiliser on soil bacteria. *Appl. Soil Ecol.* 86, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.10.004>
- Schlegel, H.G., Cosson, J.-P., Baker, A.J.M., 1991. Nickel-hyperaccumulating Plants Provide a Niche for Nickel-resistant Bacteria. *Bot. Acta* 104, 18–25. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1991.tb00189.x>
- Schofield, R.K., Taylor, A.W., 1955. The Measurement of Soil pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 19, 164–167. <https://doi.org/10.2136/sssaj1955.03615995001900020013x>
- Šimon, T., Kunzová, E., Friedlová, M., 2015. The effect of digestate, cattle slurry and mineral fertilization on the winter wheat yield and soil quality parameters. *Plant Soil Environ.* 61, 522–527. <https://doi.org/10.17221/530/2015-PSE>
- Spohn, M., Kuzyakov, Y., 2013. Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon. *Soil Biol. Biochem.* 61, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.02.013>
- Stiles, W.A.V., Styles, D., Chapman, S.P., Esteves, S., Bywater, A., Melville, L., Silkina, A., Lupatsch, I., Fuentes Grünwald, C., Lovitt, R., Chaloner, T., Bull, A., Morris, C., Llewellyn, C.A., 2018. Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 267, 732–742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.100>
- Tambone, F., Scaglia, B., D’Imporzano, G., Schievano, A., Orzi, V., Salati, S., Adani, F., 2010. Assessing amendment and fertilizing properties of digestates from anaerobic digestion through a comparative study with digested sludge and compost. *Chemosphere* 81, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.034>
- Thangavel, R., Karunanithi, R., Wijesekara, H., Yan, Y., Seshadri, B., Bolan, N.S., 2017. Phytotechnologies for Mine Site Rehabilitation: Mine Site Rehabilitation and Revegetation. pp. 203–213. <https://doi.org/10.1201/9781351247337-17>
- Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J., 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41, 219–228. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00414-2)
- Triplett, E.W., 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant Soil* 186, 29–38. <https://doi.org/10.1007/BF00035052>
- West, P.W., 2014. *Growing Plantation Forests*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-01827-0>
- Xia, A., Murphy, J.D., 2016. Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. *Trends Biotechnol.* 34, 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.010>
- Zapata-Carbonell, J., Bégeot, C., Carry, N., Choulet, F., Delhautal, P., Gillet, F., Girardclos, O., Mouly, A., Chalot, M., 2019. Spontaneous ecological recovery of vegetation in a red gypsum landfill: *Betula pendula* dominates after 10 years of inactivity. *Ecol. Eng.* 132, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.03.013>
- Zappelini, C., Alvarez-Lopez, V., Capelli, N., Guyeux, C., Chalot, M., 2018. *Streptomyces* Dominate the Soil Under *Betula* Trees That Have Naturally Colonized a Red Gypsum Landfill. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01772>
- Zhang, L., Chen, W., Burger, M., Yang, L., Gong, P., Wu, Z., 2015. Changes in Soil Carbon and Enzyme Activity As a Result of Different Long-Term Fertilization Regimes in a Greenhouse Field. *PLOS ONE* 10, e0118371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118371>

4.2 Chapitre II. Evaluer la capacité de transpiration des différentes espèces d'arbres capable de pousser sur le gypse rouge.

4.2.1 Contexte de la publication II

Après avoir mis en évidence que la composition du gypse rouge pouvait être améliorée afin d'obtenir une meilleure croissance des plantes grâce à l'apport de digestat, nous avons évalué la capacité de transpiration de 16 espèces ligneuses sur le gypse rouge *in-situ* pour répondre à la problématique de gestion des flux d'eau sur le terri. L'hypothèse est que la sélection d'espèces d'arbres ayant un taux de transpiration élevé ne serait pas antagoniste à la sélection d'espèces avec une forte capacité d'absorption des ETM. Les objectifs étaient donc (i) de tester la méthode d'estimation de LAI en utilisant la télédétection par drone basée sur l'imagerie 3D sur un terri de gypse rouge, (ii) de combiner l'estimation de LAI et les mesures d'échange gazeux pour estimer la conductance de la canopée comme un estimateur de la performance des arbres pour leurs capacités de gestion des flux d'eau, et (iii) d'évaluer la relation potentielle entre la performance de transpiration et la performance d'absorption foliaires des ETM dans un contexte de phytomanagement. L'acquisition et le traitement des images de télédétection ont été réalisés en collaboration avec Gilles Gallinet (Hekladonia). J'ai effectué par la suite les différents calculs des indices sous QGIS. Ce chapitre a été publié dans la revue « *Journal of Hazardous Materials* ».

Titre : Une approche combinée utilisant des méthodes d'imagerie 3D par drone, des mesures *in-situ* et des expériences en laboratoire pour évaluer l'évaporation de l'eau et l'absorption d'éléments traces par des espèces d'arbres poussant sur un terri de gypse rouge.

Revue : *Journal of Hazardous Materials*

Éléments essentiels : - La gestion de terri en utilisant des arbres pour l'évaporation de l'eau et l'absorption des éléments a été testée. - Une méthode de calcul du LAI à l'aide de la télédétection par drone par imagerie 3D a été proposée. - La conductance maximale de la canopée de 16 espèces d'arbres a été déduite de g_{smax} et de LAI. - *Ostrya carpinifolia* a combiné la croissance, la conductance de la canopée et l'absorption de Mn les plus élevées.



Résumé :

L'industrie extractive est de plus en plus confrontée à des problèmes de gestion des sites contaminés. Le terroir de gypse rouge du site d'Ochsenfeld est représentative de la typologie de stockage des sous-produits de l'activité d'extraction du TiO_2 . La gestion de la teneur des éléments et des flux d'eau sont les enjeux de ce site. L'objectif de cette étude était d'évaluer la conductance de la canopée (g_{max}) de différentes espèces d'arbres et la teneur en éléments dans les feuilles, en utilisant l'opportunité d'une plantation de démonstration mise en place en 2014 avec seize espèces d'arbres, combinée à une expérience en chambre de culture. Nous avons combiné les mesures d'échange gazeux avec les données de deux caméras multispectrales avec des bandes RVB et NIR embarquées sur un véhicule aérien sans pilote. Sur le terrain, *Ostrya carpinifolia*, *Maclura pomifera* et *Rhus copallina* avaient la g_{max} la plus élevée de toutes les espèces d'arbres plantées, et le taux de transpiration élevé chez *O. carpinifolia* a été confirmé dans une expérience en condition contrôlée en pot. A l'exception de *R. copallina*, les espèces à forte teneur en Mn (*O. carpinifolia*, *Betula pendula*, et *Salix aquatica grandis*) avaient une conductance stomatique élevée. *O. carpinifolia* pourrait donc être une espèce à exploiter dans la gestion des lixiviats de terroirs, notamment dans le contexte du changement climatique puisque cette espèce est bien adaptée aux milieux secs.

4.2.2 Publication II

A combined approach utilizing UAV 3D imaging methods, *in-situ* measurements, and laboratory experiments to assess water evaporation and trace element uptake by tree species growing in a red gypsum landfill

**Abdoulaye Mahamat Malabad ^a, Fabienne Tatin-Froux ^a, Gilles Gallinet ^b,
Jean-Michel Colin ^c, Michel Chalot ^{a,d}, Julien Parelle ^{a,*}**

^a Chrono-Environnement UMR6249, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

^b Hekladonia SAS, 242 Boulevard Voltaire, 75011 Paris, France

^c TRONOX, 95 Rue du Général de Gaulle, 68800 Thann, France


^d Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, 54000 Nancy, France

* Correspondence to: Laboratoire Chrono-environnement, UMR 6249, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon cedex, France.

E-mail address: julien.parelle@univ-fcomte.fr (J. Parelle).

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127977>

Journal of Hazardous Materials 425 (2022) 127977



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat



Research Paper

A combined approach utilizing UAV 3D imaging methods, *in-situ* measurements, and laboratory experiments to assess water evaporation and trace element uptake by tree species growing in a red gypsum landfill

Abdoulaye Mahamat Malabad ^a, Fabienne Tatin-Froux ^a, Gilles Gallinet ^b, Jean-Michel Colin ^c, Michel Chalot ^{a,d}, Julien Parelle ^{a,*}



^a Chrono-Environnement UMR6249, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France
^b Hekladonia SAS, 242 Boulevard Voltaire, 75011 Paris, France
^c TRONOX, 95 Rue du Général de Gaulle, 68800 Thann, France
^d Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, 54000 Nancy, France

Abstract:

The extractive industry is increasingly faced with problems of managing contaminated sites. The red gypsum landfill at the Ochsenfeld site is representative of the typology byproduct storage of the Ti-extraction activity. The management of the elemental content and the water body are the issues at this site. The aim of this study was to evaluate the canopy conductance (g_{cmax}) of various tree species and the content of elements in the leaves, utilizing the opportunity of a demonstration plantation setup in 2014 with sixteen tree species, combined with a growth chamber experiment. We combined the gas exchange measurements with the data from two multispectral cameras with RGB and NIR bands embarked on an unmanned aerial vehicle (UAV). In the field, *Ostrya carpinifolia*, *Maclura pomifera*, and *Rhus copallina* had the highest g_{cmax} of all planted tree species, and the high transpiration rate in *O. carpinifolia* was confirmed in a pot-based controlled experiment. Except *R. copallina*, the species with a high Mn content (*O. carpinifolia*, *Betula pendula*, and *Salix aquatica grandis*) had high stomatal conductance. *O. carpinifolia* could therefore be a species to exploit in the management of landfill leachates, especially in the context of climate change since this species is well adapted to dry environments.

Keywords:

UAV remote sensing, LAI, Canopy conductance, Transpiration, *Ostrya carpinifolia*.

Highlights:

Management of landfills utilizing trees for water evaporation and element uptake was tested.

A method to calculate LAI in landfills by UAV 3D imaging was proposed.

The maximal canopy conductance of 16 tree species was derived from g_{smax} and LAI.

Ostrya carpinifolia combined the highest growth, canopy conductance, and Mn uptake.

II.1. Introduction

According to the Joint Research Centre (JRC), since the 1970s, the extraction of metals has increased by more than 75% worldwide (Joint Research Centre, 2017). This significant increase in extractive activities has had a strong impact on the environment. In European Union countries, there are overall between 150,000 and 500,000 mine landfills, the majority of which are no longer active (Vaverková, 2019), which raises the question of the management of these landfills. Red gypsum landfills represent an environmental and ecological model of the typology of byproduct storage of Ti-extraction activity (high content of some trace elements (TEs): notably Fe and Mn and low biodiversity) (Edraki et al., 2014; Huang et al., 2012; Zapata-Carbonell et al., 2020). Extraction of Ti from ilmenite using the sulfuric process leads to the production of red gypsum during the neutralization of the company's wastewater with limestone. This red gypsum, accumulated over decades, allows the formation of a technosol, on which the development of vegetation is lessened due to the presence of various mineral oxides and TEs (Ciadamidaro et al., 2019; Zapata-Carbonell et al., 2019). The lack of vegetation potentially leads to mineral (including TE) leaching and dust enriched in TEs. Moreover, this red gypsum is stored on a waterproof structure that requires appropriate management of the incoming and outgoing water masses. The revegetation of landfills is therefore an important issue to better manage water flows via evapotranspiration and to limit the spread of dust. Phytomanagement, which has recently become an alternative for site and soil management, comprises a set of sustainable techniques using tree species *in situ*, for example, to restore some ecosystem services, to control erosion, and more relevantly here to regulate water flow (Cundy et al., 2016). Trees indeed contribute to water balance through transpiration. Using a lysimeter-based approach, *Populus* sp. was found to enhance evapotranspiration and to reduce bore leaching by accumulation in aerial biomass (Robinson et al., 2007). Important mass flow may enhance plant nutrient acquisition by promoting the movement of nutrients from the soil to the root and aerial parts of the plant (Huang et al., 2017). Mn moves freely in the xylem sap and is transported to leaves via transpiration stream with little redistribution (Ducic and Polle, 2005). Barber (1995) described and modelled nutrient uptake by crop tree species and concluded that the water flux is a key parameter. Element uptake modelling was used to describe K, P, Zn and Mn uptake by different tree species and to further demonstrate the role of water flux (Adhikari and Rattan, 2000; Brouder, 1994; Chen, 1990; Sadana and Claassen, 2000). Previous studies have reported negative relationships between foliar TE content and transpiration rate in tree species (Kitao et al., 1997; Milan, 2012; Pajevic et al., 2009; Arsenov et al., 2020). In plants,

metals exert their toxic action, mostly by damaging chloroplast and disturbing photosynthesis and the inhibition of photosynthesis is the consequence of interference of metal ions with photosynthetic enzymes and chloroplast membranes, thus inducing a biochemical limitation of stomatal conductance, as reviewed in Aggarwal et al., (2011). Many studies have shown that an excess supply of TE leads to significant changes in the water relations of tree species (Pandey and Sharma, 2003; Vernay et al., 2007). It has also been observed in experiments conducted under greenhouse conditions with *Populus* hybrids that the transpiration rate decreased with an increase in mixed TE (Cd, Cr, Cu, and Zn) content (Chandra and Kang, 2016). The transpiration rate and stomatal conductance in *Phaseolus vulgaris* were reduced by a high Zn content (Van Assche et al., 1980) or by ZnSO₄ at 600 mg/kg in peat moss soil (Kasim, 2007). Mn, which is one of the major components of the red gypsum sediment at the Ochsenfeld site (Zapata-Carbonell et al., 2019), accumulates predominantly in the plant shoot (Page et al., 2006). High Mn content leads to excess TE deposition in photosynthetic cells and might potentially impair cellular metabolism (Fernando et al., 2013), which may lead to metal toxicity in cells. High Mn content can decrease the net photosynthetic rate, stomatal conductance, internal carbon dioxide concentration and transpiration in several genotypes of cotton (Tavanti et al., 2019). The transpiration of plants depends not only on tree species physiology, *i.e.*, the ability to regulate the stomatal aperture but also the leaf area. The transpiration capacity is estimated by the transpiring surface of plants and thus by the leaf area index (LAI). This index is the ratio between the sum of the foliar area and the unit of ground area (Watson, 1947). LAI is traditionally obtained by harvesting all leaves of a plot and by measuring the surface of each leaf. Modern alternative methods have been developed. Flatbed scanners have made this process more efficient, but it is still laborious, time consuming and destructive. It is possible to use instruments based on atmospheric sensors (LI-COR LAI-2000 Plant Canopy Analyser and CI-100 Plant Canopy Analyser) or a linear array of photosynthetically active radiation sensors (AccuPAR Ceptometer) to estimate the LAI (Breda, 2003; Peper and McPherson, 1998; Wilhelm et al., 2000). These indirect non-destructive techniques comprise the application of a logarithmic regression and allometric equation, which is faster to set up for homogeneous covers but has not yet been applied for multispecific row plantations (Nowak, 1996). As the alternative method, the Light Detection and Ranging (LiDAR) can be used as an active sensor which is based on the emission of a highly collimated laser pulse and analysing the reflected signal (Lin, 2015) to estimate LAI using volumetric methods such as surface differencing (Loudermilk et al., 2009) where the digital terrain model (DTM) is subtracted to the digital surface model (DSM). In a recent review (Wang and Fang, 2020), where LiDAR technology,

LAI retrieval and validation methods are reviewed, it is concluded that terrestrial laser scanning (TLS), airborne laser scanning (ALS) or spaceborne laser scanning (SLS) data can be used for the estimation of the vegetation LAI. While the use of LiDAR for the estimation of LAI has shown promising results especially in forest applications (Alonzo et al., 2015; Lefsky et al., 1999), other approaches have been developed. Among these new technologies, the use of unmanned aerial vehicles (UAV) to record low-altitude images is becoming increasingly widespread (Zhang and Kovacs, 2012) and is the only automated alternative for heterogeneous cover. LAI estimation from UAV-based remote sensing multispectral imagery (Hunt et al., 2008) is increasingly reported, for instance in agriculture (Yao et al., 2017), in mangrove (Tian et al., 2017) and forest (Lin et al., 2021) ecosystems. Although UAVs have been used in landfill monitoring (Rauhala et al., 2017; Shahmoradi et al., 2020), to our knowledge, no studies have been conducted on the use of UAV to estimate LAI at landfills under phytomanagement. Most authors have used vegetation indices based on photogrammetry analysis, such as the normalized difference vegetation index (NDVI), which is used to monitor the degree of vegetation greenness (Tucker, 1979; Zarco-Tejada et al., 2012). NDVI data have proven to be a robust approach for estimating biotic stress (chlorophyll deficiency) and abiotic stress (water drought). NDVI is a ratio of operation of reflectance per specific bands ($\text{NIR}-\text{R}/\text{NIR}+\text{R}$) for multispectral signature where NIR and R are respectively the near-infrared and red bands. It is also a measure of reflectance and an estimation of vegetation growth and biomass (Gandhi et al., 2015); however, this index is not quantitative and has to be calibrated using field data.

The present study focuses on the Ochsenfeld red gypsum landfill, located in northeastern France, with an area of 80 ha. The main management issues at the Ochsenfeld site are (i) to revegetate the site to stabilize the soil, thus limiting the dispersion of dust and TEs, or for producing a valuable Mn-enriched biomass and (ii) to increase the evapotranspiration potential of the site, thus reducing the volume of water stored in the landfill that remains to be treated. On part of the site, we set up a phytomanagement trial in 2014 with different tree species to select the tree species best suited to the site conditions (Ciadamidaro et al., 2019). Considering these particular objectives and conditions, our hypothesis was that the selection of tree species for TE uptake capacity would not be antagonist to the selection of species with a high transpiration rate. The opportunity of the 5-year-old demonstration plantation was used to estimate leaf area with a surface integration method using UAV-based remote sensing, to screen transpiration capacity and to determine TE content in leaves. The leaf surface and surface area of the trees were originally developed using a surface integration method to quantitatively

estimate the LAI. In the present study, we further used low-altitude photos obtained with UAVs that allow three-dimensional integration to obtain developed surfaces. The transpiration rate of some selected tree species growing on anthroposol from Ochsenfeld site and its relationship with the Mn content were further explored under controlled conditions with a more accurate method (by utilizing the weight loss method) to potentially confirm the field results. The objectives of these experiments were (i) to test the method of LAI estimation by using UAV 3D-imaging-based remote sensing on landfill, (ii) to combine LAI estimation by using UAV 3D-imaging and gas exchange measurements for estimating the maximum canopy cover conductance as an estimator of tree performance for their capacities of management of water flow, and (iii) to test a potential concomitance between transpiration performance and leaf element uptake performance in a phytomanagement context.

II.2. Materials and methods

II.2.1. Experimental design

II.2.1.1. Field experiment

The pilot site of a 1-ha area was implemented in April 2014 on a storage landfill of mining byproducts located in the municipality of Thann in Northeast France (Fig. 1) and was fully described by Ciadamidaro et al. (2019). The soil has silty and alkaline characteristics and is enriched mainly in Mn, Fe, and S (Assad et al., 2017). A 30 cm layer of backfill was added on top of the red gypsum before planting. According to Ciadamidaro et al. (2019), only 16 species of the 18 planted species with a significant growth performance were selected for this study (Table 1).

Table 1. List of the tree species used in the present study and their abbreviations

Abu	<i>Acer buergerianum</i>	Por	<i>Platanus orientalis</i>
Agi	<i>Acer ginnala</i>	Pst	<i>Pterocarya stenoptera</i>
Bpa	<i>Betula papyrifera</i>	Qac	<i>Quercus acutissima</i>
Bpe	<i>Betula pendula</i>	Rco	<i>Rhus copallina</i>
Csp	<i>Catalpa speciosa</i>	Sag	<i>Salix aquatica grandis</i>
Csi	<i>Cedrela sinensis</i>	Sal	<i>Salix alba</i>
Mpo	<i>Maclura pomifera</i>	Upu	<i>Ulmus pumila</i>
Oca	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Zse	<i>Zelkova serrata</i>

II.2.2. Ecophysiological analysis

For the field experiment, the maximum stomatal conductance (g_{max} expressed in mol H₂O/leaf m²/s) was monitored between June and July 2019 on one fully sun-exposed leaf (n=9 randomly chosen by species) using a portable gas-exchange system (Licor-6400 Lincoln, Nebraska) at 400 ppm CO₂, 30 °C block temperature, photosynthetically active radiation at 1400 μmol/m²/s and ambient air humidity (min = 50% and max = 80%). Each measurement was recorded when the stabilization of g_{max} was observed (approximately 3 min). Minimum leaf water potentials (Ψ_{min} expressed in MPa) were measured immediately after on the same twig with a pressure chamber (Scholander et al., 1965). These measurements were collected between 10 a.m. and 4 p.m. local time to ensure light conditions supported maximum photosynthetic rates and minimum Ψ_{min} .

For the growth chamber experiment, the plant transpiration stream was measured through water loss method by weighing pots packed in a plastic bag for 4 h to limit the evaporation of the soil. To express the transpiration per unit leaf area, an estimation of the total leaf area was performed by measuring the leaf length of all leaves of each measured plant. The etalon curve leaf area – leaf length and leaf area – and leaf dry mass, realized for intermediate time and final time measurements, respectively, were measured for a subset of leaves from each species with a WinRHIZO scanner (Regent Instrument, Quebec, Canada). Details of the equations used are provided in the supplemental information Fig. S1.

II.2.3. Remote sensing

UAV-based remote sensing was used to calculate the height of tree species and vegetation indices (LAI and NDVI). Two high-resolution digital cameras, Sony (RX100 M3; Tokyo, Japan) for red (R: 620 to 670 nm), green (G: 490 to 570 nm), and blue (B: 450 to 490 nm) bands and Canon (S110; Tokyo, Japan, modified by LDP LLC Max, Carlstadt, USA) for near-infrared (NIR: 680 to 800 nm) bands with a resolution of 8 megapixels, were embarked on the drone TurtleQuad® designed by Gilles Gallinet. On 24 May 2019, on a clear and sunny day a flight of the UAV was conducted aloft at 30 to 35 metres from the ground between 11:30 a.m. and 12:40 a.m. local time to collect spectral radiance at ground from aerial photos. A total of 547 photos were taken to generate the first 3-D model (dense cloud and shaded model) using Metashape-AGISOFT photogrammetric software (version 1.6.1, Agisoft LLC, Saint Petersburg, Russia). This 3-D model used 11 ground targets (GCPs) for the 3-dimensional

calibration of the photogrammetric model, recorded by traditional terrestrial acquisition using a high-precision real-time kinematic - global positioning system (RTK-GPS). From this 3-D model, still using Metashape-AGISOFT, an orthomosaic projection generated two multiband orthophotographs: one with red (band1), green (band2), and blue (band3) bands, and the second with near-infrared (band1), green (band2), and blue (band3) bands. The data from these multiband orthophotographs were then processed using QGIS version 3.10.1-A Coruña (QGIS Development Team, 2018).

The source images had the following resolution: 9.89 mm/pix for RGB and 1.46 cm/pix for NIR. The two RGB and NIR orthomosaics were first calculated using Metashape, each separately with their native resolution. They were then resampled when exported by Metashape to provide images with a GSD (Ground Spatial Distance) of 10 cm/pix. Processing in QGIS was then performed with this resampled resolution of 10 cm/pix for all bands used. The sampling algorithm during orthomosaic generation process and the resampling algorithm during export were the same *i.e.*, bilinear interpolation. The geometric calibration of the optics was carried out using the Metashape software, which has built-in tools for this. The overlay between the captured images was chosen to be greater than 80% in both length and width. Furthermore, the flight lines overlapped. Therefore, each pixel of the orthomosaic was calculated from at least nine photographs (see supplemental information Fig. S2 and S3). The mapping was deliberately done beyond the perimeter of the study area to avoid any edge effect. The maps extended at least 25 m beyond the lateral limits of the actual study area.

The tree height (TH) was calculated in QGIS by calculating the difference in altitude between the DSMs and the DTM (Eq. 1). The DSM was the 3D surface of the cover canopy of vegetation. The precision of the DSM was $x = 3$ cm, $y = 3$ cm and $z = 5$ cm. The DTM was a 3-D area of the soil without vegetation. The DTM was recorded by traditional terrestrial acquisition using a high precision RTK-GPS. This DTM integrated the reading of the 11 ground targets used for the 3-dimensional calibration of the photogrammetric model. The accuracy of the RTK GPS reading on the ground was $x, y = 1$ cm and $z = 2$ cm. The soil DTM and vegetation canopy DSM were in the same projection system and the same altimeter setting.

$$TH = DSM - DTM$$

(1)

To obtain the LAI, we calculated the ratio between the leaf area of canopy cover (LA) and the area projected at the ground of the canopy cover (GC) of the tree species (Eq. 2). The leaf area of the canopy cover was measured on Agisoft Metashape by manual delineation of the tree crown (Fig. 2). The area of the canopy cover projected on the ground was calculated on QGIS also by manual delineation of the tree crown.

$$LAI = \frac{LA}{GC} \quad (2)$$

The LAI multiplied by the mean of the g_{smax} allowed us to obtain the canopy conductance (g_{cmax} expressed in mol H₂O/ground m²/s), which is controlled mainly by these two variables (Granier et al., 2000).

The NDVI values were calculated according to the following equation (Eq. 3) using QGIS, where NIR and R are reflectance values in the near-infrared and red wavelengths, respectively, given by Tucker (1979). The NDVI values range from 0.2 to 0.8 for vegetation and are unitless. High NDVI values indicate healthy and dense green vegetation, and low NDVI values indicate moisture-stressed and sparse vegetation (Drisy et al., 2018; Gessesse and Melesse, 2019).

$$NDVI = \frac{NIR - R}{NIR + R} \quad (3)$$

The experimental site was divided into eight different plots as described by Ciadamidaro et al. (2019). Each plot consisted of a replicate of the 18 different tree species planted in rows (one row by species). For the present UAV-based study, the experimental site was partitioned row-by-row, constituting eight replicates per species (Fig. 1C). The results for each species were the median and the quartiles of these eight rows.

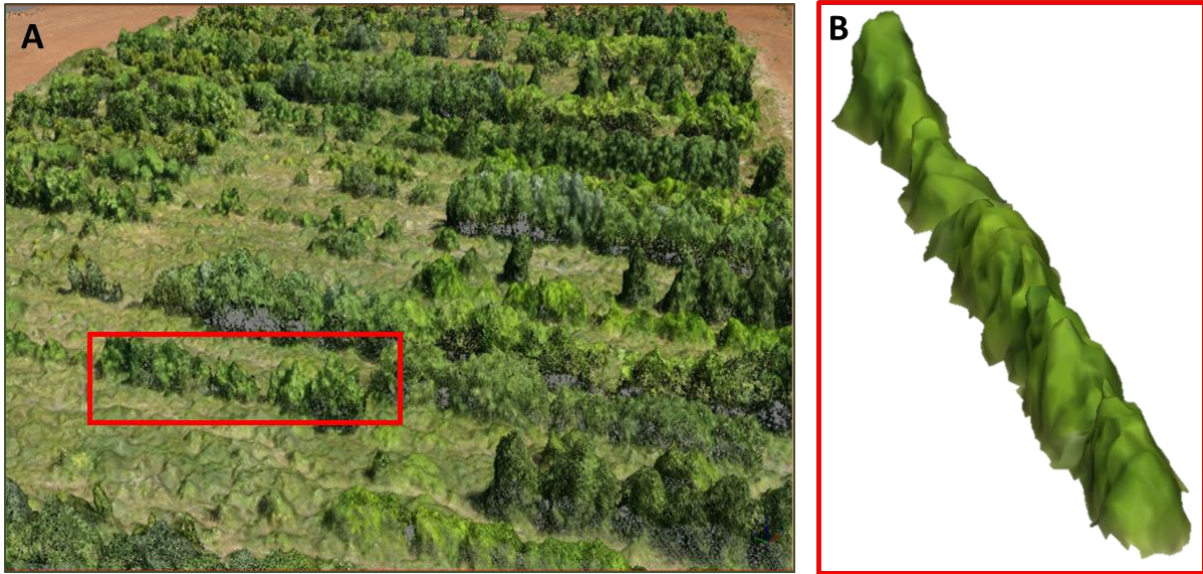


Fig. 2. Three-dimensional UAV view of the canopy cover at the experimental Ochsenfeld site. (A) General view of the demonstration site generated at-sensor reflectance orthomosaics using Metashape-AGISOFT photogrammetric software. (B) Detailed view of one plot corresponding to one tree species obtained by manual delineation of the tree crown. Each row of a tree species was cut, isolated and trimmed, which further allowed us to estimate the developed leaf area using a surface integration method.

II.2.4. Elemental analysis

For each tree species, the leaves used for gas exchange measurements were washed with deionized water and dried at 70 °C for 72 h. These dried leaf samples were ground using a ball mill (Retsch MM300, Eragny, France). Mineralization was realized by acid digestion with concentrated HNO₃ using a VELP DK6 heating digester (VELP Scientifica, Usmate Velate, Italy). As described by Assad et al. (2017), the total elemental content (Al, B, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, Sr, Ti, and Zn) in the leaves from the field samples was determined using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Radial ICAP 6500 Model, Thermo Fischer Scientific, Inc., Pittsburgh, USA). For the pot experiment, Mn content was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA).

II.2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software version 4.0.4, the R Foundation for Statistical Computing (R Core Team, 2021), at a significance level when $P < 0.05$. To verify

the homoscedasticity and the normality of the all dataset, we had used a Levene test (Levene, 1960) and Shapiro–Wilk test (Shapiro and Wilk, 1965) respectively. As dataset did not fit the assumption of the normal distribution, they were analysed with non-parametrical tests. For all considered variables, the statistically significant difference between tree species within a variable was analysed using a Kruskal-Wallis test by ranks. Spearman's rank-order correlation was performed to compare the different variables assayed and to compare the rank of different tree species for each variable. A confusion matrix with a 10-fold cross-validation was performed to estimate the generalized accuracy average and to evaluate confusion between the different tree species, using caret package (version 6.0-90).

II.3. Results

II.3.1. *In-situ* measurements

II.3.1.1. Transpiration proxies

We observed significant differences in g_{smax} and Ψ_{min} values among the 16 tree species (Fig. 3). *O. carpinifolia*, *R. copallina* and *M. pomifera* exhibited significantly higher g_{smax} to water vapour than a group of 11 other species (Fig. 3A). The two species, *S. aquatica grandis* and *B. pendula*, had intermediate g_{smax} values. The Ψ_{min} ranged from -2.27 to -0.09 MPa, with Ψ_{min} values of -0.28 ± 0.13 MPa and -2.03 ± 0.08 MPa for *M. pomifera* and *A. ginnala*, respectively (Fig. 3B). The rank of the different tree species for their Ψ_{min} value was significantly similar to the rank obtained for the g_{smax} values (Spearman rank correlation with $P = 0.003$), suggesting that the two proxies could be used for estimating differences in the transpiration stream. As exceptions, *M. pomifera* and *R. copallina* combined a high g_{smax} with a high Ψ_{min} .

The analysis of the C_i (concentration of CO_2 in the intercellular spaces of the leaf) versus g_{smax} graph underlined that for the two species, *C. sinensis* and *A. buergerianum*, the lowest conductance might be attributed to a biochemical limitation (Fig. 4). These two species were clearly limited in their CO_2 assimilation among all tested tree samples, with a negative correlation between C_i and g_{smax} . The other species, e.g., *O. carpinifolia*, *R. copallina* and *M. pomifera*, seemed to cope better with the soil conditions.

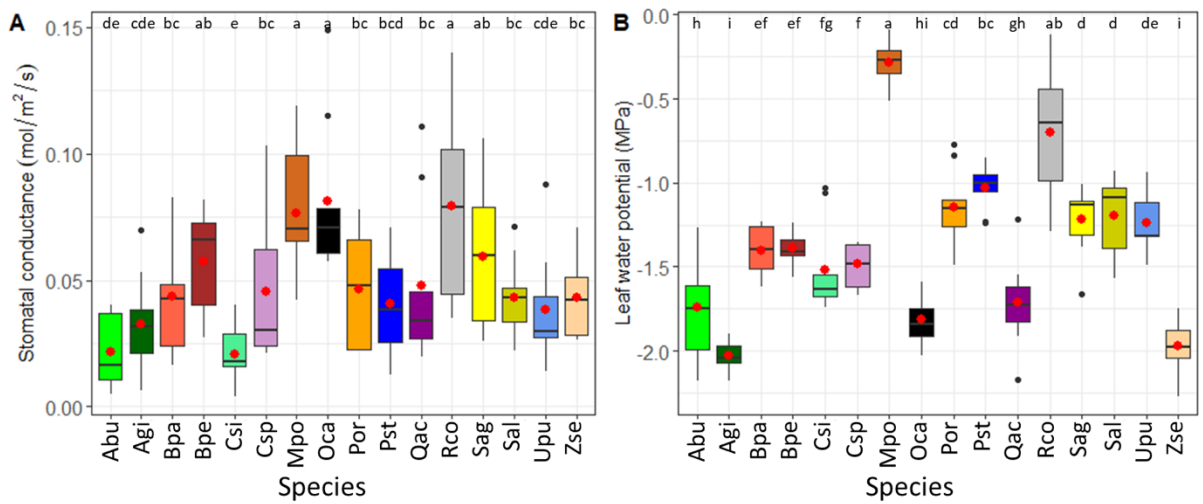


Fig. 3. Transpiration proxies (mean (red dot), median, quartiles, range, and outliers) ($n=9$). (A) g_{smax} ($\text{mol H}_2\text{O}/\text{leaf m}^2/\text{s}$) and (B) Ψ_{min} (MPa), measured on the 16 tree species growing at the experimental Ochsenfeld site. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

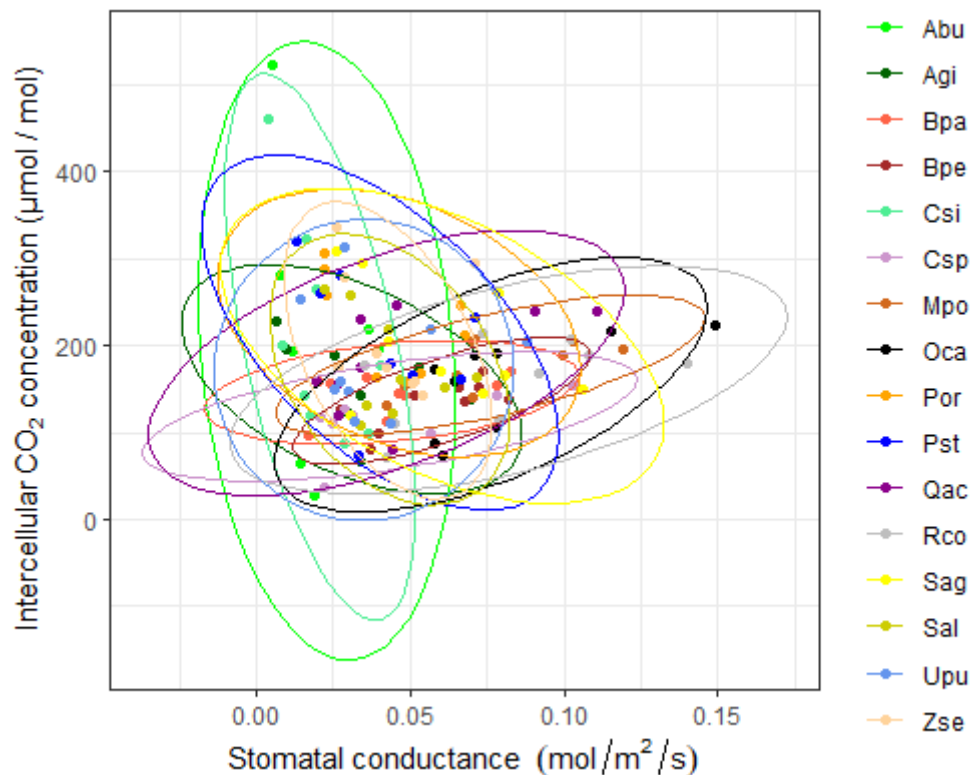


Fig. 4. Relationship between intercellular CO_2 concentration (C_i expressed in $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol air}$) and maximal stomatal conductance to water vapour (g_{smax} expressed in $\text{mol H}_2\text{O}/\text{leaf m}^2/\text{s}$) for the 16 tree species growing at the experimental Ochsenfeld site. Each colour represents one of the 16 trees studied, with 9 measurements per tree, and ellipses correspond to the 0.95 confidence interval.

II.3.1.2. Remote sensing

UAV-based remote sensing allowed us to obtain the tree height (expressed in m) (Fig. 5A), LAI (expressed as the ratio of m^2 of leaf area to m^2 of ground area, Fig. 5B), and NDVI value (Fig. 5C) of the tree species present at the Ochsenfeld site. For these three parameters obtained using UAV-based remote sensing, the rank order of the tree species was highly similar, with $P < 0.001$ (Spearman's rank-order correlation). We further combined the LAI data (Fig. 5A) and g_{smax} data (Fig. 3A) to obtain the maximal canopy conductance (g_{cmax} expressed as $\text{mol H}_2\text{O}/\text{ground m}^2/\text{s}$, Fig. 5D).

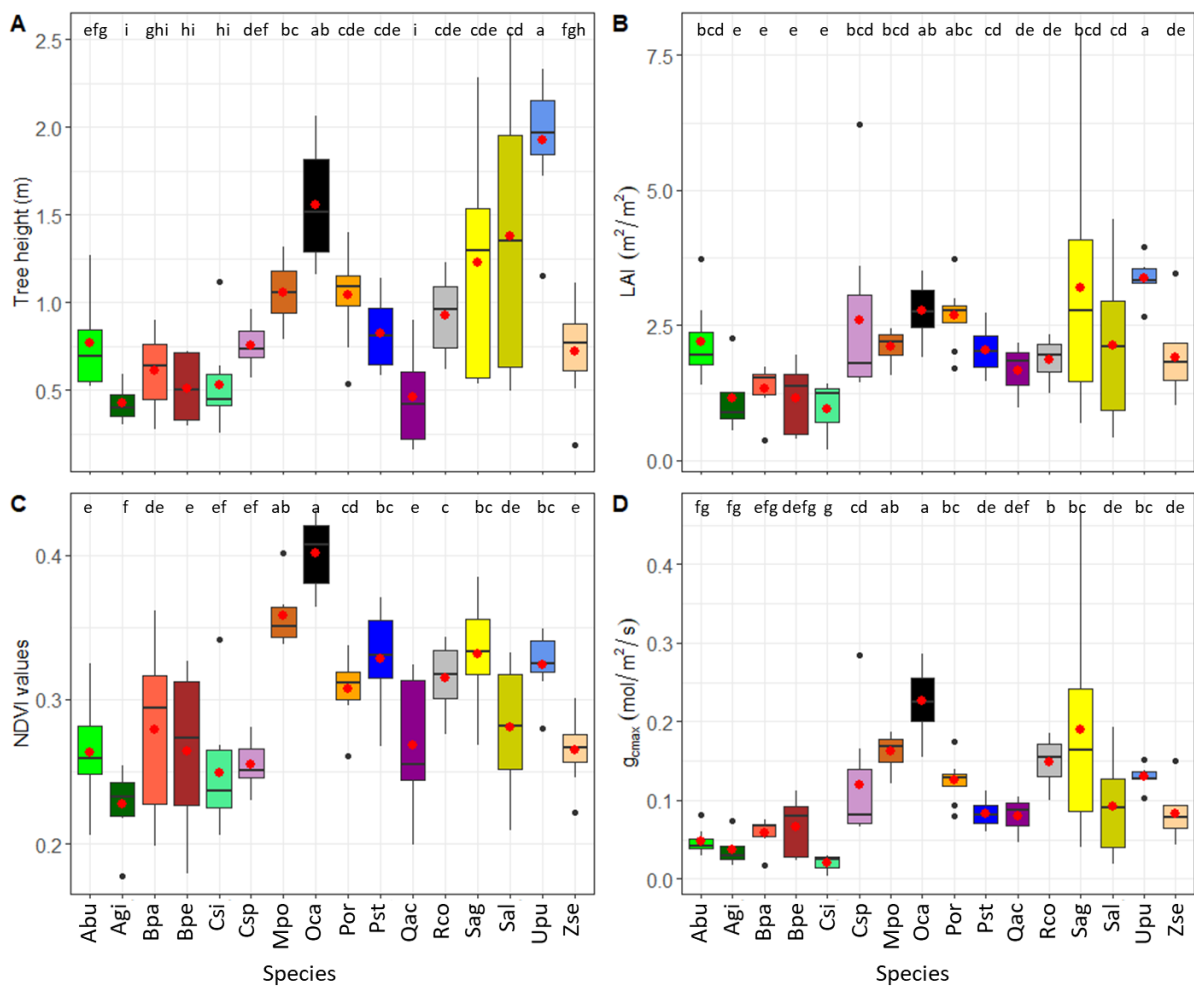


Fig. 5. UAV-based remotely sensed parameters of the 16 tree species growing at the experimental Ochsenfeld site (mean (red dot), median, quartiles, range, and outliers) ($n=8$). (A) Tree height (m), (B) LAI values (leaf $m^2/\text{ground } m^2$), (C) NDVI values and (D) g_{cmax} ($\text{mol H}_2\text{O}/\text{ground } m^2/\text{s}$). Boxes with the same letter did not differ significantly from each other based on a pairwise Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

U. pumila, *O. carpinifolia*, *M. pomifera*, *S. aquatica grandis* and *P. orientalis* had the greatest heights among the tree species planted at the Ochsenfeld site in 2014, whereas *A. ginnala*, *C. speciosa*, *Q. acutissima*, *B. pendula* and *B. papyrifera* had the lowest heights. The other tree species had an intermediate height (Fig. 5A). The LAI data followed the same trend, with *U. pumila*, *O. carpinifolia*, *P. orientalis*, *S. aquatica grandis* and *M. pomifera* having the greatest LAI values, while *A. ginnala* and *B. pendula* had the lowest LAI values (Fig. 5B). The NDVI values for the study area plotted in the 0.23 (*A. ginnala*) - 0.40 (*O. carpinifolia*) range (Fig. 5C), which reflects the difference in tree growth and cover as discussed above. As an exception, the *P. stenoptera* species, despite a relatively low height, had one of the highest NDVI values. With the highest LAI and g_{smax} values, *O. carpinifolia* had the greatest g_{cmax} (Fig. 5D), while *A. ginnala* had values 10 times lower than those of *O. carpinifolia*. Among the tree species studied, only *O. carpinifolia*, *M. pomifera*, *R. copallina*, *S. aquatica grandis*, *U. pumila*, *P. orientalis* and *C. speciosa* had on average a g_{cmax} greater than 0.1 mol H₂O/ground m²/s.

II.3.1.3. Foliar elemental content and leaf water status

The elemental content detected in leaves was significantly different among species (Fig. 6). Mn, the major element to be considered for the management of red gypsum sediment, was found in greater amounts in species belonging to the Betulaceae (*B. pendula*, *B. papyrifera*, and *O. carpinifolia*) and Salicaceae (*S. alba* and *S. aquatica grandis*) families. *B. pendula* and *O. carpinifolia* had the highest Mn contents, with values 3 times greater than those of *C. sinensis*, for example. Similarly, Zn was found at significantly higher levels in Salicaceae and Betulaceae species, except for *O. carpinifolia* (Fig. 6). *O. carpinifolia*, *Z. serrata*, and *S. aquatica grandis* had on average 4 -5 times higher Fe content than *Q. acutissima* and *R. copallina* (Fig. 6C). The remaining 11 species had intermediate values. Mg was the element for which the largest variations in leaf content among tree species were observed. *A. ginnala* and *R. copallina* had Mg leaf contents 4 to 5 times lower than those of *B. pendula*, *B. papyrifera*, *U. pumila*, *S. alba* and *M. pomifera*. Leaf contents and associated statistical data for the entire ICP set of 16 elements are provided in supplemental Table S1.

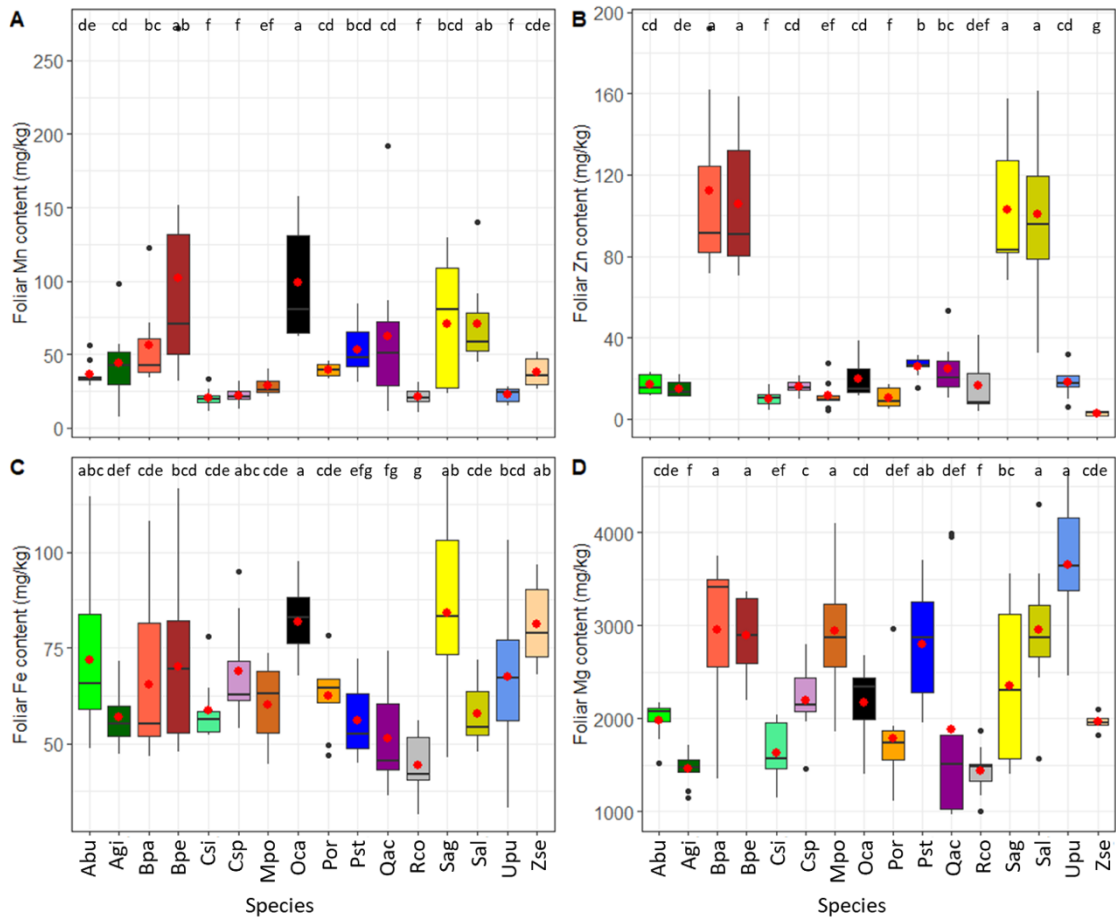


Fig. 6. Elemental content (mg/kg DM) (mean (red dot), median, quartiles, range, and outliers) (n=9) measured in leaves of the 16 tree species at the experimental Ochsenfeld site with (A) Mn, (B) Zn, (C) Fe and (D) Mg. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other using a pairwise Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$).

To highlight the potential concomitance between the foliar elemental content and transpiration stream proxies (g_{smax} and Ψ_{min}), the rank of the different tree species was obtained using the Spearman rank coefficient (Table 2). The species were ranked for g_{smax} significantly similarly to their foliar elemental contents in K, Mn (Fig. 6) and Sr. The relationship between leaf Mn content and g_{smax} showed that tree species that had a high Mn content also had high g_{smax} (*O. carpinifolia*, *B. pendula*, and *S. alba*). Four of the tree species with the lowest g_{smax} also had low Mn contents (*A. ginnala*, *U. pumila*, *A. buergerianum*, and *C. sinensis*). *R. copallina* and *M. pomifera* combined a low foliar Mn content with high g_{smax} values. Similarly, the Ψ_{min} values were also positively correlated with several elements, namely, Ca, Cd, Mg and Sr, and negatively correlated with Cu, Fe and Si. The other elements, *i.e.*, Al, B, Na, P, S, Ti and Zn, were only related to the tree species and did not correlate to any of the two transpiration proxies.

Table 2. Spearman rank-order correlation between g_{smax} , Ψ_{min} , and the foliar elemental content

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns = not significant

	Al	B	Ca	Cu	Cd	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	S	Si	Sr	Ti	Zn
g_{smax}	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
Ψ_{min}	ns	ns	**	*	**	*	ns	**	ns	ns	ns	ns	***	**	ns	ns

We further performed a 10-fold cross-validation confusion matrix on all tree species that includes all studied parameters (supplemental Table S2). A 80% generalized accuracy was determined, with 6 species showing 100% accuracy (Csi, Qac, Rco, Sal, Upu and Zse). Most of confusion occurred between species of the same plant genera (*e.g.* Bpa *versus* Bpe, Sal *versus* Sag), that showed similar g_{cmax} values (Fig. 5) and elemental content (Fig. 6). The g_{cmax} values contributed in increasing confusion among species of different genera (*e.g.* Qac *versus* Pst).

II.3.2. Growth chamber experiments

Five of the 16 tree species at the Ochsenfeld site were further chosen to analyse the transpiration rate and compare with field proxy data (measured after 90 and 152 days of growth). This will allow us to obtain quantitative transpiration rate data at the scale of the whole plant for each of the species studied, which is not easy to obtain at the field scale. *O. carpinifolia* had the highest transpiration rate, with a value greater than 1.5 mmol H₂O/leaf m²/, which was higher than that for the other 4 tree species at day 90 (Fig. 7A). The transpiration rates were not significantly different at the intermediate time (90 days) and at the end time (152 days), except for *O. carpinifolia*, for which a significant decrease was observed, but its transpiration rate remained twice that of all other species. The rank order of these five tree species according to their transpiration rate was the same as that obtained with g_{smax} in the field experiment (*O. carpinifolia* > *B. pendula* > *S. aquatica grandis* > *P. stenoptera* > *A. buergerianum*).

The foliar Mn content of *B. pendula* was significantly higher (approximately 1000 mg/kg DM) than the Mn content of the other tree species, which values ranging from 100 to 400 mg/kg DM. *O. carpinifolia* had an intermediate Mn content, which was significantly higher than that of *A. buergerianum*, *P. stenoptera* and *S. aquatica grandis* (Fig. 7B). There was no

significant difference between the two measurement times despite a slight increase (1.2 on average) in leaf Mn content for *B. pendula*, which is a Mn-accumulating species. No significant rank-order correlation was observed between foliar Mn content and transpiration rate.

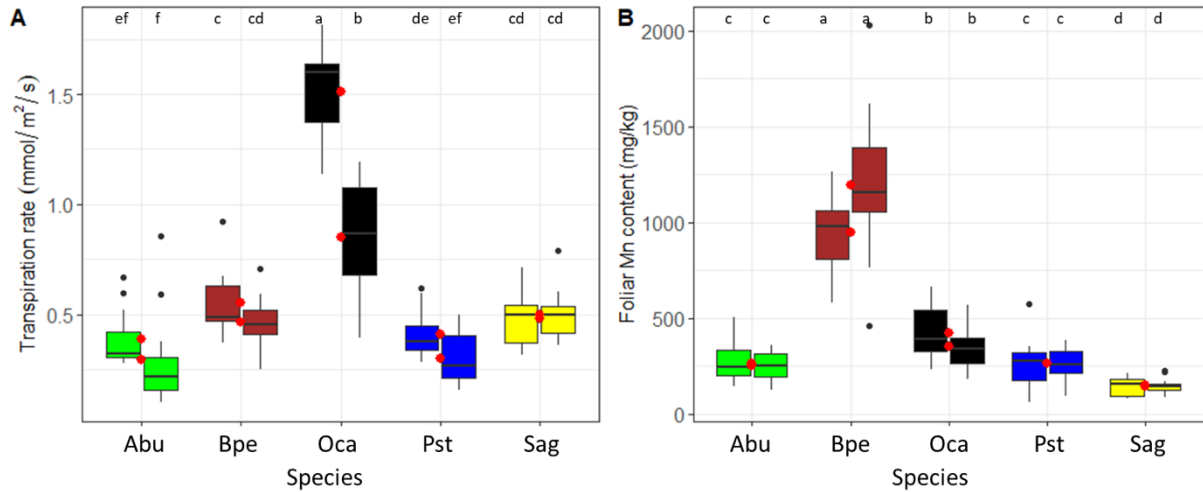


Fig. 7. (A) Transpiration rate (mmol H₂O/leaf m²/s) and (B) leaf Mn content (mg/kg DM) (mean (red dot), median, quartiles, range, and outliers) (n = 24) measured on the 5 tree species grown in Ochsenfeld soil in chamber experiments. For each species, the first boxplot was measured at 90 days, and the second was measured at 152 days. Boxes with the same letter did not differ significantly from each other based on a pairwise Kruskal–Wallis test (P < 0.05).

II.4. Discussion

II.4.1. *Ostrya carpinifolia* exhibited the highest transpiration capacity at the leaf level

According to their ecophysiological traits, the field experiment allowed us to identify three groups of tree species. The first group comprised *R. copallina* and *M. pomifera*, which had the highest g_{max} , combined with the highest Ψ_{min} values, close to 0 MPa. We hypothesized that this performance of these two species could be due to their highly developed root system (Ciadamidaro, unpublished data), which provides them access to deep water, allowing them to maintain their Ψ_{min} close to zero despite a high maximum stomatal conductance to water vapour. The second group included *A. buergerianum* and *C. sinensis*, with the lowest g_{max} and Ψ_{min} ; the negative relationship among g_{max} and CO₂ intercellular concentration underlines a biochemical limitation of the stomatal aperture, which is in agreement with their low growth performance. This group of tree species would not be able to grow optimally on this site and

could not be retained for revegetation. The third group was composed of all other tree species, including *O. carpinifolia*, characterized by a stomatal limitation of C_i concentration and a classical negative correlation between the stomatal aperture and leaf water potential (Comstock and Mencuccini, 1998; Cowan, 1965). Stomata regulate water loss from the leaves to maintain xylem pressure in a range that will protect xylem from embolism. Ψ_{50} is the xylem water potential provoking a 50% loss of hydraulic conductivity. At this potential, which is species-dependent, water transport in the xylem is highly impaired and can lead to drastic damage in the plant. In the current study, considering the Ψ_{\min} between -2.27 and -0.09 MPa compared with Ψ_{50} recorded in the literature for the main temperate forest tree species (Choat et al., 2012), the water constraint was not sufficiently severe for all tree species to cause water transport damage. For example, we recorded a Ψ_{\min} of -1.39 ± 0.1 MPa for *B. pendula* compared with a Ψ_{50} of -2.4 MPa that is known for this species (Herbette and Cochard, 2010). Ψ_{\min} for *O. carpinifolia* was -1.81 ± 0.14 MPa in this study compared with a Ψ_{50} equal of -4.31 MPa in the study conducted by Kiorapostolou et al. (2019). In contrast, the Ψ_{\min} of *S. aquatic grandis* was -1.22 ± 0.2 MPa and was close to the Ψ_{50} commonly described for this genus (-0.91 to -2.32 MPa) (Cochard et al., 1992), while no data are available in the literature for this species to date to the knowledge of the authors. Therefore, with a Ψ_{\min} greater than Ψ_{50} , there was no risk for creating trapped gas emboli in the water transport system (Choat et al., 2012), and stomata should be fully or partially opened. Indeed, *Salix* species are well known to exhibit a high transpiration rate and would be interesting candidates to improve the evapotranspiration of landfills in phytomanagement solutions (Frédette et al., 2019). However, based on our site conditions, the stomatal limitation clearly moderated its performance, and the maximum stomatal conductance recorded for *B. pendula* or *O. carpinifolia* remained higher. Regarding the g_{\max} for *O. carpinifolia*, Tomasella et al. (2019) obtained values more than twice as high as ours, but *O. carpinifolia* was grown in a greenhouse under controlled conditions in pots containing lightweight substrate and potting compost irrigated at field capacity. Indeed, a measurement of g_{\max} over a few days would have been influenced by meteorological conditions, while we chose a sunny week and recorded a moderate decrease in Ψ_{\min} . In our pot study under controlled conditions, a ranking similar to that obtained with the field experiment was found for the transpiration rate in well-irrigated conditions after three and five months of growth (Fig. 7), based on their g_{\max} values on a subset of species with different performances (*O. carpinifolia* > *B. pendula* > *S. aquatica grandis* > *P. stenoptera* > *A. buergerianum*). Indeed, we should consider that g_{\max} measured during a few days of summer is a good proxy of transpiration performance at the leaf level under these field conditions.

II.4.2. *Ostrya carpinifolia* had the best growth performance, as estimated by UAV-based remote sensing

Among the 16 tree species that were planted in April 2014 at the Ochsenfeld site, *U. pumila*, *O. carpinifolia*, *M. pomifera* and *S. aquatica* showed the highest growth (estimated by height) compared with the other tree species, such as *B. pendula* or *Q. acutissima*. The species that had the greatest height in our soil condition, *U. pumila*, was one of the dominant tree species at the Pingshuo mining landfill located in northern Shanxi Province in China (Yuan et al., 2020); *U. pumila* is resistant to drought and fast growing. *U. pumila* is a species with high adaptability to different climates: glacial temperate, temperate, and subtropical zones (Zhao et al., 2015). The *O. carpinifolia* species was one of the intermediate-growing species in 2015 (direct height measurements, Ciadamidaro et al., 2019) but became the best-performing tree species during our last measurement in 2018, after 4 years of growth at the Ochsenfeld site. It also performed very well at two other phytomanagement sites (Ciadamidaro, unpublished data). *O. carpinifolia* needs a low amount of resources for growth (Tardella et al., 2019) and plays an important function in the forest vegetation in sub-Mediterranean areas in Italy at altitudes lower than 1200 m. It has been described as a species capable of growing on shallow and poorly developed soils, mainly on limestone and gypsum (Pasta et al., 2016). *M. pomifera* intrinsically has a strong adaptive capacity in nutrient-poor soils and a high resistance to severe drought (Khaleghi et al., 2019). The species belonging to the *Salix* genus is known to be a pioneer species suitable for cultivation in difficult sites with suboptimal soil conditions (Kuzovkina and Volk, 2009). The authors of this review explain that *Salix* species have a good adaptation to soil conditions, rapid growth, and the highest biomass production obtained in short rotations, combined with high transpiration rates; therefore, *Salix* species would be good candidates for phytomanagement in landfills. In contrast, *B. pendula*, which spontaneously colonized the red gypsum landfill, (Zapata-Carbonell et al., 2019) did not grow well in the experimental plot, probably because of the presence of other competing herbaceous species. *Betula* species are known to be affected by planting density, which significantly reduces their crown and branch sizes (Mäkinen, 2002; Wang et al., 2017). The poor growth of *Quercus* species observed at the Ochsenfeld site could be explained by the intrinsic low-growth character of this genus and/or the vulnerability of the species to poor soil nutrient status and moisture deficiency (Demchik and Sharpe, 2000).

II.4.3. UAV-based surface integration method was innovatively applied to a landfill phytomanagement to estimate tree LAI and canopy conductance

The LAI values obtained in the present study by using the UAV-based surface integration method were within the same order as those found in previous studies. For instance, the LAI for *S. alba* and *S. aquatica grandis* were in the range of 2.1-3.4 leaf m²/ground m² in our study, comparable to the 1-5.5 leaf m²/ground m² range found for other *Salix* species (Mirck and Volk, 2009). In that study, the LAI values measured with a LI-COR LAI 2000 for *Salix*, one of the best shrub willow varieties growing at an industrial landfill, peaked during the beginning of July and August and were minimal in November. The LAI development course of poplar and willow clones was obtained, and LAI values also greatly varied during the season (Rüth et al., 2007). LAI values obtained during May in that study (which correspond to our sampling date) were in the 2-3 leaf m²/ground m² range, similar to the values obtained for our *Salix* clones. *U. pumila* and *O. carpinifolia* had the highest LAI values in our study, which were also well correlated with tree heights. Similar relationships between vegetation height and LAI have been found in other studies (Luo et al., 2015; Rüth et al., 2007). The LAI values that varied on average from 0.23 to 0.40 leaf m²/ground m² for the different tree species studied at the Ochsenfeld site showed that the vegetation was dense because the NDVI of a densely vegetated plot or area tends towards positive values (Viana et al., 2019). Therefore, high NDVI values would indicate high NIR reflectance and low red reflectance related to high leaf density and/or high chlorophyll content, while low NDVI values would indicate a diminution of NIR reflectance indicating leaf damage or high red reflectance due to low leaf density. Indeed, the NDVI is intrinsically correlated to LAI by using the calculation mode but integrates chlorophyll content and leaf health (Tucker, 1979). In our study, except for *P. stenoptera*, the five tree species that had significantly higher NDVI values were the species with the greatest g_{smax} (*O. carpinifolia*, *R. copallina* and *M. pomifera*) and the highest LAI (*O. carpinifolia*, *U. pumila* and *S. aquatica grandis*). Despite a relatively low height, *P. stenoptera* had a high density of long and pinnately leaves, thus could have led to an underestimation of LAI with our method. Regardless, the low g_{cmax} recorded for this species could be mainly attributed to its relatively low stomatal conductance compared to other species with similar NDVI values. The species with the highest NDVI values, *i.e.*, *O. carpinifolia*, also had the highest LAI value. These values reflect the acclimation of this tree species to site conditions, as discussed above. Correlation coefficients of 0.77 and 0.99 between NDVI and LAI were obtained at two sites for vegetation

grown in a semiarid grassland (Fan et al., 2009). At these sites, NDVI and LAI both reached peak values in August and became the maximum values. The present study underlined that our LAI calculation was robust, as it correlated with the NDVI, the widely used spectral reflectance index. The NDVI remains a qualitative proxy, *i.e.*, an index that needs to be calibrated with LAI field measurements (Fan et al., 2009). The g_{cmax} proxy used in the present study was innovatively measured by combining the surface integration method using UAV-based remote sensing and 3-D imaging with traditional g_{smax} measurements and provided direct quantitative values allowing a better comparison of different tree species performances. The negative point of this surface integration method was the manual delineation of leaf area, which was tedious. With the rapid development of UAV technology, UAV-based remote sensing has been widely used in forestry, agriculture, and vegetation monitoring (Lu et al., 2020). UAV-based remote sensing has many advantages, such as instant information acquisition, high image spatial resolution, convenient operation, high manoeuvrability, freedom from cloud interference, and low cost. Our present study was in line with this, as it combined remote sensing and gas exchange measurements to determine the canopy conductance of different tree species. In view of the diversity of tree species used, other multispectral indices would have been interesting to consider. These indices could take into account spectral ranges between 0.4–2.5 μm (Yang et al., 2017). Remote sensing approaches based on thermal signature as a proxy of transpiration streams (Xue and Su, 2017) through indices such as the Crop Water Stress Index (CWSI) could be used.

Evapotranspiration estimation at the field level requires water balance measurements using lysimetric methods to collect sap flow measurements, as detailed in a review on classical methods (Rana and Katerji, 2000), or modelling methods based on stomatal conductance measurements, meteorological parameters, and extractable soil water measurements (Granier et al., 2000). All of these methods are quantitatively precise and have been improved well but are time-consuming and cannot be applied for rapid screening of plant performance in phytomanagement contexts. However, a key parameter was the estimation of a LAI that conditioned the evaporative surface. This LAI obtained by using the surface integration method combined with g_{smax} allows us to obtain an estimation of the maximal canopy conductance g_{cmax} . Although this proxy is quantitative, it could not replace the methods cited above; however, it allowed obtaining a rapid comparison indicator of the difference in performance for the species to evaporate water at the landfill. We found that the best performing species should be *O. carpinifolia*, *M. pomifera*, *R. copallina*, *S. aquatic grandis*, *U. pumila* and *P. orientalis*.

However, *R. copallina* behaved as an invasive species in the experimental plot at the Ochsenfeld site, which casts doubt on its potential use in phytomanagement scenarios. Although they performed very well in terms of growth, *S. aquatica grandis* and *U. pumila* with a Ψ_{\min} close to Ψ_{50} and limited g_{\max} would be sensitive tree species in the event of drought. Therefore, we recommended only three species, *i.e.*, *O. carpinifolia*, *M. pomifera* and *P. orientalis*, to be utilized for phytomanagement at the Ochsenfeld site.

II.4.4. Mn uptake and transpiration rate were correlated

In our study, the concentrations of the different elements, including TEs (Table S1), were lower than those generally observed at anthropized sites (Kabata-Pendias, 2011). This might be because tree sampling was conducted in early summer, when the elemental concentrations were not yet at their optimal levels (Migeon et al., 2009). These authors demonstrated that the elemental content in the leaves collected in October was significantly higher than that collected in June, suggesting seasonal variability in the leaf elemental content. The other elemental contents found in our study were lower than the basal physiological compositions recorded in tree species (Fe=150 mg/kg DM, Mn=200 mg/kg DM and Zn=50 mg/kg DM) (Assad et al., 2017; Greger, 2004). Excess of these elements in plant tissues may cause toxicity by damaging the cell structure (Zhao et al., 2012) and therefore may affect plant growth and limit transpiration. With elemental contents slightly lower than usual physiological values, our tree species are therefore unlikely to have problems in their physiological processes, such as transpiration. However, Zn concentrations measured in *Betula* and *Salix* genera in the present field experiments were slightly higher than the physiological levels (Kabata-Pendias, 2011), which is consistent with our previous studies (Ciadamidaro et al., 2019; Zapata-Carbonell et al., 2020). Mn was also found to accumulate in *Betula* species in the present field experiment, which also confirms our previous data (Ciadamidaro et al., 2019; Zapata-Carbonell et al., 2020). In the pot experiment, high Mn content measured in the tree species in particular in *B. pendula*, could be explained by the conditions of the experiment conducted in growth chamber, favorable for the accumulation of ET. However, the use of only five tree species in the laboratory experiment failed to show a rank-order correlation between Mn content and transpiration rate.

In addition to other factors, such as mobility of the element, tissue age, and biomass of the tree, water flow in the tree plays an important role in element uptake and translocation to the shoot, and water is necessary for circulation in the transpiration stream (Brown and Shelp, 1997). The foliar Mn content in some tree species grown in the red gypsum sediment at the Ochsenfeld site was correlated with the transpiration rate of the tree. Although the objective at the Ochsenfeld site is not to decontaminate the sediment, the choice of Mn-accumulating tree species with a high transpiration rate may be relevant to phytomining (Ent et al., 2018) or ecocatalysis processes (Escande et al., 2015). Xu et al. (2006) nicely reported that the Mn content in a leaf decreased by approximately 90% when it was wrapped in a transparent plastic bag to suppress the transpiration rate. In contrast, other elemental contents were not related to transpiration, *e.g.*, Zn uptake was not affected by the transpiration capacity of the tree species. Managing both metal uptake and water flow at landfills is therefore highly dependent on tree species and the elements of concern.

II.5. Conclusions

Here, we combined a UAV-based remote sensing approach and a surface integration method using 3D imagery to determine the LAI values of different species of trees planted in rows. This approach is an alternative to the long and tedious methods of dendrometric and ecophysiological measurements. We utilized the g_{cmax} ($g_{\text{smax}} \times \text{LAI}$) proxy, which was found to be a relevant tool for evaluating the performance of selected trees at the Ochsenfeld site, and in particular for estimating the capacities of trees to manage water flows, compared with traditional proxies, such as NDVI, LAI or g_{smax} when considered separately. With the highest growth and g_{cmax} values compared with other planted woody species, *O. carpinifolia* had the greatest potential to maximize transpiration flows in these harsh conditions. These field measurements were confirmed by measurements performed under controlled conditions on the same substrate. *O. carpinifolia* also retained Mn in its leaves, similar to the other tree species in the Betulaceae family, *B. pendula*, even though Mn concentrations were highest under controlled conditions. This opens new perspectives in phytomining and ecocatalysis research domains that combine phytomanagement with added values in the enriched biomass. High transpiration of the woody cover obtained with this woody species could drastically reduce the volumes of water infiltrating through the landfill and therefore limit the associated environmental risks and treatment costs. Species more classically used in phytomanagement,

such as those belonging to the Salicaceae (genus *Salix*), are undoubtedly less relevant at this site because they have a much more limited potential transpiration rate. In the event of multiple choices of tree species to manage these landfills, *M. pomifera* and *P. orientalis* would be preferred tree species, in addition to *O. carpinifolia*. Their potential would now need to be confirmed by, *e.g.*, a lysimeter installation for the accurate and representative measurements of the evapotranspiration rate and water balance at the site. In the future, an atmospheric correction will be provided to manipulate spectral reflectance at ground level to remove potential atmospheric effects. As advanced sensors with large spectral diversity are being developed, we foresee the use of remote sensing as a method to evaluate both plant and soil metal concentrations, and thus correlate metal concentration and UAV-based ecophysiological parameters for a better assessment of phytomanagement strategies in landfill restoration. Regarding the Ochsenfeld study site, which is representative of landfills from the extractive industry, the key issue is the implementation of a plant cover that maximizes water evapotranspiration after deposits have ceased and that limits the aerial dissemination of red gypsum dust, which is imposed by the French regulator. The presence of trees with high evapotranspiration capacities would allow to maximize these impacts. Additionally, we are foreseeing the use of phytomining in future projects to recover metals from the plant biomasses. However, given the huge amounts of metals in the substrate, it would be inappropriate to expect metal depollution.

CRedit authorship contribution statement

Abdoulaye Mahamat Malabad: Investigation, Writing – original draft. **Fabienne Tatin-Froux:** Investigation, Writing – original draft. Julien Parelle: Investigation, Writing – original draft. **Gilles Gallinet:** UAV acquisition, Methodology, Writing – original draft. **Jean-Michel Colin:** Resources, Writing – original draft, site maintenance. **Michel Chalot:** Writing – review & editing, Funding acquisition, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

We acknowledge Dr. Nadia Morin-Crini, Marie-Laure Toussaint and Caroline Amiot of the PEAT2 platform for the metal analyses. This work was supported by the French National Research Agency [PHYTOCHEM ANR-13-CDII-0005-01] and the French Environment and Energy Management Agency [PROLIPHYT ADEME- 1172C0053]. A.M.M. received a PhD grant from the Ministry of Higher Education, Research and Innovation of the Republic of Chad [561 PR/MESRI/SG/DGCNOU/DEPOB/ SEPOB/2018].

Appendix A. Supporting information

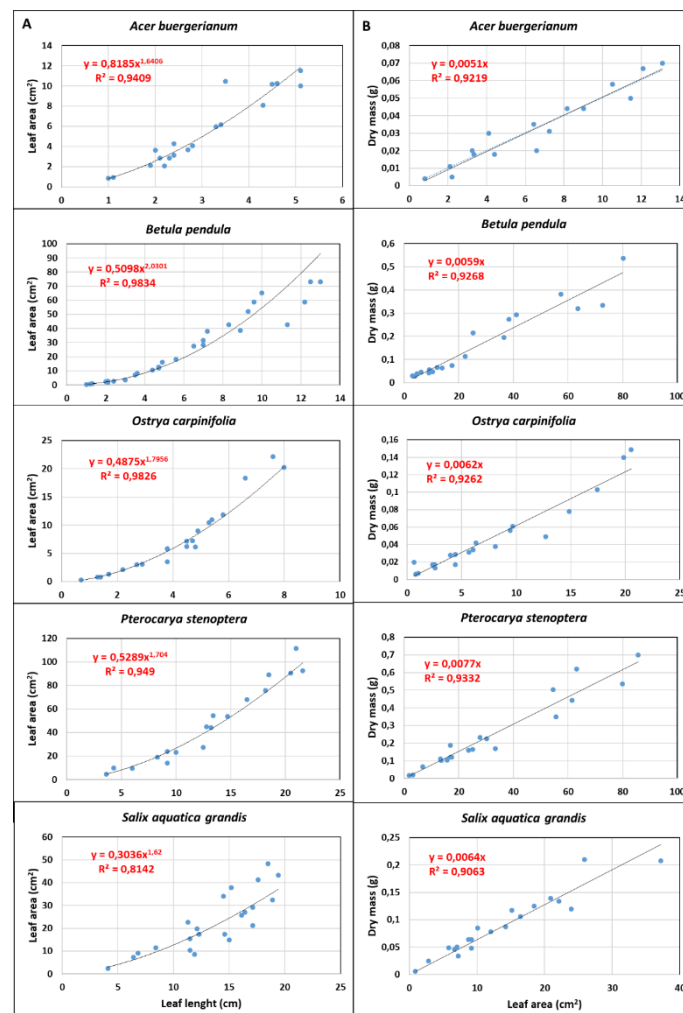


Fig. S1. The etalon curves of the five tree species grown on the Ochsenfeld soil in chamber experiments, performed for a subset of leaves from each species with a WinRHIZO scanner. (A) Power relationship between leaf area (cm²) and leaf length (cm) for non-destructive measure at 90 days. (B) Linear relationships between leaf dry mass (g) and leaf area (cm²) for final measure at 152 days.

Table S1.

Elemental content (mg/kg DM) measured in leaves of the 16 tree species at the experimental Ochsenfeld site (mean, standard deviation, and significance letter obtained using a pairwise Kruskal–Wallis test with $P < 0.05$, the same letter did not differ significantly from each other).

Element	Species	Abu	Agi	Bpa	Bpe	Csi	Csp	Mpo	Oca	Por	Pst	Qac	Rco	Sag	Sal	Upu	Zse
Al	Mean	21,3	20,0	24,8	25,1	20,5	31,4	21,9	35,0	24,0	19,6	17,8	8,3	29,2	26,7	29,6	27,0
Al	StD	9,8	2,3	10,3	9,7	6,5	7,4	4,9	8,7	4,9	6,7	8,2	4,0	18,8	7,6	12,0	2,4
Al	P	defg	fg	cdefg	bcdef	defg	ab	cdefg	a	bcdef	efg	g	h	bcdef	abcde	abcd	abc
B	Mean	45,3	27,8	53,0	54,4	24,4	39,1	52,4	29,0	26,9	57,4	45,6	22,7	31,6	53,2	43,8	47,6
B	StD	12,6	4,7	6,5	9,2	5,9	11,0	16,6	4,7	6,6	22,6	16,0	4,5	11,3	15,8	9,3	7,2
B	P	abc	ef	a	a	ef	cd	ab	ef	ef	ab	bc	f	de	ab	bc	abc
Ca	Mean	8768,6	7582,5	11505,1	11998,5	12258,8	11219,5	20394,8	12814,9	11696,2	15756,2	9661,3	6775,9	14974,7	18056,8	18668,2	16936,4
Ca	StD	1658,2	1773,5	1940,5	2975,8	3876,8	3259,5	5470,1	1954,2	1816,0	3318,9	3844,4	2451,9	10394,6	4902,8	6389,3	1913,3
Ca	P	ef	f	cd	cd	cd	cde	a	bc	cd	ab	def	f	bcd	a	a	a
Cd	Mean	>LQM	>LQM	0,3	0,2	0,1	0,2	0,6	0,1	>LQM	>LQM	>LQM	>LQM	0,9	0,6	>LQM	0,1
Cd	StD	>LQM	>LQM	0,2	0,1	0,0	0,0	0,7	0,1	>LQM	>LQM	>LQM	>LQM	0,5	0,2	>LQM	>LQM
Cd	P	>LQM	>LQM	b	b	b	b	ab	b	>LQM	>LQM	>LQM	>LQM	a	a	>LQM	b
Cu	Mean	7,4	8,1	5,1	5,6	6,0	7,3	4,5	6,9	6,6	8,7	8,3	5,9	6,4	6,6	4,2	4,1
Cu	StD	2,1	2,6	0,8	0,8	1,8	0,9	1,2	1,4	1,7	1,6	2,6	1,4	1,3	1,5	0,9	1,1
Cu	P	abc	abc	fgh	efg	def	abc	gh	bcd	cde	a	ab	def	cde	bcde	h	h
Fe	Mean	71,8	57,0	65,4	70,1	58,6	68,9	60,1	81,7	62,4	56,2	51,3	44,4	84,2	57,7	67,4	81,2
Fe	StD	20,6	8,3	20,9	22,0	8,2	13,6	10,2	9,7	9,5	9,9	13,3	9,1	25,9	9,1	21,1	11,7
Fe	P	abc	def	cdef	bcde	cdef	abcd	cdef	a	cde	efg	fg	g	ab	cdef	bcde	ab
K	Mean	11761,1	6931,3	7680,7	8748,8	8955,2	6733,4	12733,0	6222,7	5304,0	7525,8	5968,9	6642,1	13875,0	7441,1	13001,1	6528,0
K	StD	1996,4	2197,8	2379,9	2106,0	2686,9	1694,1	4488,8	1098,6	948,1	1269,6	1069,8	1515,3	6603,2	1668,5	2899,5	819,5
K	P	a	def	cde	bc	bc	def	ab	efg	g	cd	fg	def	ab	cde	a	defg
Mg	Mean	1983,1	1465,4	2947,7	2889,3	1624,2	2189,0	2939,3	2164,5	1780,9	2801,6	1876,0	1433,7	2355,0	2957,9	3655,8	1960,7
Mg	StD	209,1	190,7	813,1	438,4	300,8	371,8	640,3	450,0	506,7	593,6	1221,2	260,3	861,6	757,6	772,9	90,2
Mg	P	cde	f	a	a	ef	c	a	cd	def	ab	def	f	bc	a	a	cde
Mn	Mean	36,6	64,2	56,3	102,2	20,4	22,1	28,6	98,8	39,8	53,2	62,4	21,4	71,0	71,0	22,5	38,2
Mn	StD	9,0	65,0	28,0	76,2	6,5	6,2	6,3	42,4	4,5	19,5	55,2	6,1	43,5	30,3	5,3	10,8
Mn	P	de	cd	bc	ab	f	f	ef	a	cd	bcd	cd	f	bcd	ab	f	cde
Na	Mean	64,6	50,5	66,9	59,9	61,2	52,2	57,6	69,5	72,8	72,3	70,6	48,2	80,2	69,3	111,7	57,7
Na	StD	12,2	5,8	27,0	7,9	10,2	6,9	11,1	10,7	27,8	20,5	20,7	4,8	20,7	13,9	39,7	6,7
Na	P	bcd	gh	cdef	cde	cde	fgh	efg	bc	bcde	bcd	bcd	h	ab	bcd	a	def
P	Mean	2459,3	2396,6	2702,1	3180,6	2401,3	2538,6	2808,9	1789,1	1319,2	1889,7	1971,3	2316,1	2306,1	1667,5	2699,9	1806,8
P	StD	542,2	625,3	581,3	682,8	402,7	339,8	390,9	142,4	260,6	426,3	275,4	505,0	312,5	177,2	460,7	134,1
P	P	cd	cd	abcd	a	cd	bcd	ab	efg	g	ef	e	d	d	fg	abc	efg
S	Mean	4284,3	1295,6	2406,9	2710,4	4184,7	2521,3	1794,8	3612,5	4730,2	2736,8	2663,2	2048,5	5050,1	6275,2	1514,4	2146,5
S	StD	1092,7	127,2	399,4	626,3	1359,2	448,8	370,1	725,3	1353,7	526,8	451,6	426,7	803,5	1738,8	299,5	262,2
S	P	bcd	i	ef	e	cd	ef	gh	d	abc	e	e	g	ab	a	hi	fg
Si	Mean	170,8	162,9	103,1	92,7	124,2	114,8	126,6	138,4	118,6	125,0	103,3	70,0	127,1	82,2	222,3	270,9
Si	StD	31,3	40,1	26,8	19,9	28,7	31,7	22,3	26,6	35,3	40,2	20,7	19,1	63,6	34,3	36,7	77,6
Si	P	ab	b	def	fg	cd	cde	cd	bc	cde	cde	ef	g	cde	fg	a	a
Sr	Mean	10,4	9,1	15,8	14,8	16,2	13,6	31,3	17,6	19,9	21,4	10,7	8,6	22,9	34,1	22,3	27,5
Sr	StD	2,9	2,3	2,7	4,6	4,8	4,0	12,5	2,6	4,2	5,5	4,0	2,7	15,9	10,4	9,6	4,5
Sr	P	hi	i	def	efg	def	fgh	ab	cde	bcd	bc	ghi	i	cdef	a	bcd	ab
Ti	Mean	2,6	1,6	2,7	2,5	1,5	1,8	1,5	2,4	3,2	1,6	1,3	1,0	3,0	2,2	2,6	3,8
Ti	StD	1,8	0,4	1,1	1,0	0,4	0,7	0,6	0,5	1,0	0,9	0,5	0,5	2,0	0,9	1,1	1,2
Ti	P	cde	efg	abc	abcd	efg	def	fg	abcd	ab	efg	fg	g	bcd	cde	abcd	a
Zn	Mean	16,9	14,8	112,5	105,7	9,8	15,7	11,7	19,7	10,4	25,9	24,9	16,6	102,7	100,7	18,0	2,9
Zn	StD	4,7	4,0	41,4	33,9	4,0	3,9	7,0	9,9	4,6	4,8	12,9	14,7	31,5	37,8	7,4	1,5
Zn	P	cd	de	a	a	f	cd	ef	cd	f	b	bc	def	a	a	cd	g

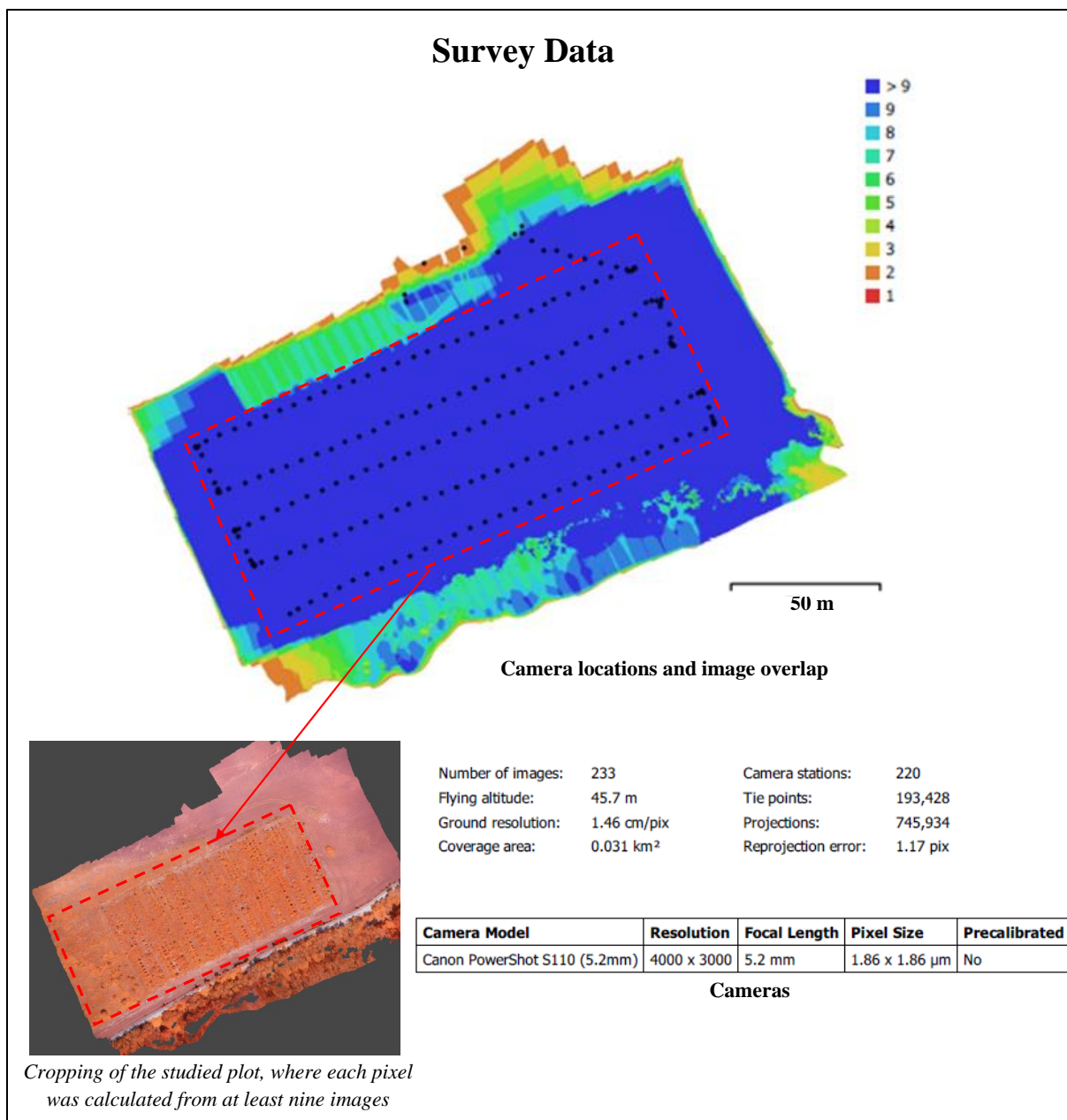


Fig. S2. Overlay of mapping areas and cropping on the study plot at Ochsenfeld site (NIR) from Metashape software modelling report. Black dotted lines represent the flight line, and each black dot represents one photo.

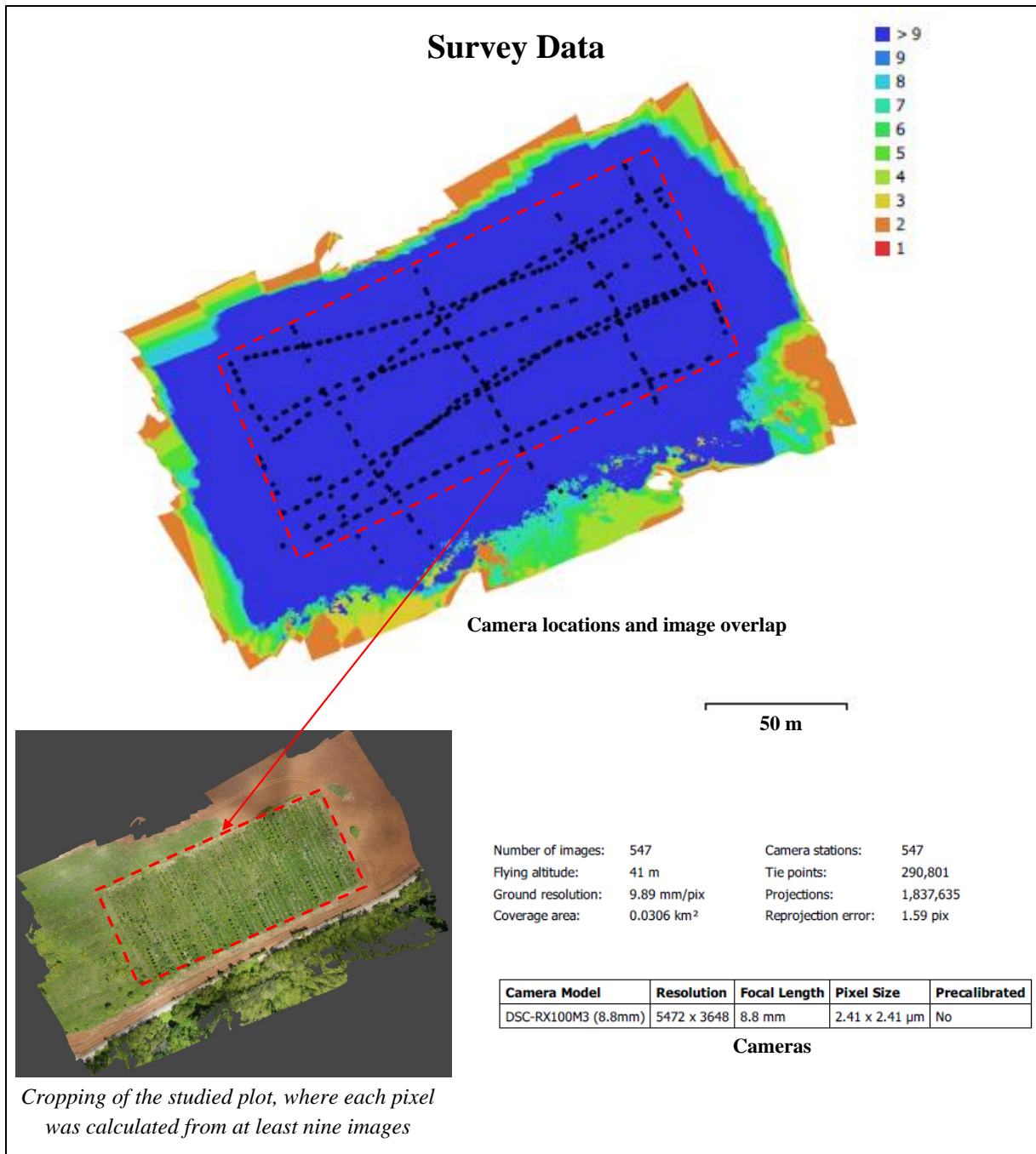


Fig. S3. Overlay of mapped areas and cropping on the study plot at Ochsenfeld site (RGB) from Metashape software modelling report. Black dotted lines represent the flight line, and each black dot represents one photo.

Table S2.

A 10-fold cross-validation confusion matrix of 16 tree species used in the present study. Accuracy average was 80%.

		Abu	Agi	Bpa	Bpe	Csi	Csp	Mpo	Oca	Por	Pst	Qac	Rco	Sag	Sal	Upu	Zse
Prediction	Abu	50%	0	10%	0	20%	10%	0	0	0	0	0	0	0	0	10%	0
	Agi	0	67%	0	0	11%	0	0	0	0	0	22%	0	0	0	0	0
	Bpa	0	0	57%	43%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bpe	0	0	14%	57%	0	0	0	0	0	0	0	0	29%	0	0	0
	Csi	0	0	0	0	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Csp	13%	0	0	0	0	75%	0	0	0	0	12%	0	0	0	0	0
	Mpo	0	0	0	0	0	0	86%	0	0	14%	0	0	0	0	0	0
	Oca	0	0	0	0	0	0	0	75%	0	0	0	0	25%	0	0	0
	Por	0	0	0	0	0	0	0	0	86%	0	0	0	0	14%	0	0
	Pst	0	0	0	0	0	0	0	0	0	75%	25%	0	0	0	0	0
	Qac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%	0	0	0	0	0
	Rco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%	0	0	0	0
	Sag	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80%	20%	0	0
	Sal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%	0	0
	Upu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%	0
	Zse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
		Reference															

References

- Adhikari, T., Rattan, R.K., 2000. Modelling zinc uptake by rice crop using a Barber-Cushman approach. *Plant and Soil* 227, 235–242. <https://doi.org/10.1023/A:1026575032724>
- Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B., Munjal, A., Baunthiyal, M., Sharma, V., 2011. Metal Toxicity and Photosynthesis, in: *Photosynthesis: Overviews on Recent Progress and Future Perspectives*. pp. 16: 229-236.
- Alonzo, M., Bookhagen, B., McFadden, J.P., Sun, A., Roberts, D.A., 2015. Mapping urban forest leaf area index with airborne lidar using penetration metrics and allometry. *Remote Sensing of Environment* 162, 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2015.02.025>
- Arsenov, D., Nikolić, N., Borišev, M., Župunski, M., Pilipovic, A., Orlović, S., Pajević, S., 2020. Greenhouse Assessment of Citric Acid-Assisted Phytoremediation of Cadmium by Willows (*Salix* spp.) – Effect on Photosynthetic Performances and Metal Tolerance. *Baltic Forestry* 25, 203–212. <https://doi.org/10.46490/vol25iss2pp203>
- Assad, M., Tatin-Froux, F., Blaudez, D., Chalot, M., Parelle, J., 2017. Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill. *Environ Sci Pollut Res* 24, 5019–5031. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8242-4>
- Barber, S.A., 1995. *Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach*. John Wiley & Sons.

- Breda, N.J.J., 2003. Ground-based measurements of leaf area index: a review of methods, instruments and current controversies. *Journal of Experimental Botany* 54, 2403–2417. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg263>
- Brouder, S.M., 1994. Evaluation of a Mechanistic Model of Potassium Uptake by Cotton in Vermiculitic Soil. *Soil Science Society of America journal* v. 58, 1174–1183. <https://doi.org/10.2136/sssaj1994.03615995005800040024x>
- Brown, P.H., Shelp, B.J., 1997. Boron mobility in plants. *Plant and Soil* 193, 85–101. <https://doi.org/10.1023/A:1004211925160>
- Chandra, R., Kang, H., 2016. Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. *Forest Science and Technology* 12, 55–61. <https://doi.org/10.1080/21580103.2015.1044024>
- Chen, J.-H., 1990. Soil pH and Phosphorus and Potassium Uptake by Maize Evaluated with an Uptake Model. *Soil Science Society of America journal* v. 54, 1032–1036. <https://doi.org/10.2136/sssaj1990.03615995005400040017x>
- Choat, B., Jansen, S., Brodrigg, T.J., Cochard, H., Delzon, S., Bhaskar, R., Bucci, S.J., Feild, T.S., Gleason, S.M., Hacke, U.G., Jacobsen, A.L., Lens, F., Maherali, H., Martínez-Vilalta, J., Mayr, S., Mencuccini, M., Mitchell, P.J., Nardini, A., Pittermann, J., Pratt, R.B., Sperry, J.S., Westoby, M., Wright, I.J., Zanne, A.E., 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491, 752–755. <https://doi.org/10.1038/nature11688>
- Ciadamidaro, L., Parelle, J., Tatin-Froux, F., Moyen, C., Durand, A., Zappelini, C., Morin-Crini, N., Soupe, D., Blaudez, D., Chalot, M., 2019. Early screening of new accumulating versus non-accumulating tree species for the phytomanagement of marginal lands. *Ecological Engineering* 130, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.02.010>
- Cochard, H., Cruiziat, P., Tyree, M.T., 1992. Use of Positive Pressures to Establish Vulnerability Curves: Further Support for the Air-Seeding Hypothesis and Implications for Pressure-Volume Analysis. *Plant Physiol.* 100, 205–209. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.205>
- Comstock, J., Mencuccini, M., 1998. Control of stomatal conductance by leaf water potential in *Hymenoclea salsola* (T. & G.), a desert subshrub. *Plant Cell Environ* 21, 1029–1038. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00353.x>
- Cowan, I.R., 1965. Transport of Water in the Soil-Plant-Atmosphere System. *The Journal of Applied Ecology* 2, 221. <https://doi.org/10.2307/2401706>
- Cundy, A.B., Bardos, R.P., Puschenreiter, M., Mench, M., Bert, V., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Li, X.N., Weyens, N., Witters, N., Vangronsveld, J., 2016. Brownfields to green fields: Realising wider benefits from practical contaminant phytomanagement strategies. *Journal of Environmental Management* 184, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.03.028>
- Demchik, M.C., Sharpe, W.E., 2000. The effect of soil nutrition, soil acidity and drought on northern red oak (*Quercus rubra* L.) growth and nutrition on Pennsylvania sites with high and low red oak mortality. *Forest Ecology and Management* 136, 199–207. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(99\)00307-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(99)00307-2)
- Drisya, J., D, S.K., Roshni, T., 2018. Chapter 27 - Spatiotemporal Variability of Soil Moisture and Drought Estimation Using a Distributed Hydrological Model, in: Samui, P., Kim, D., Ghosh, C. (Eds.), *Integrating Disaster Science and Management*. Elsevier, pp. 451–460. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812056-9.00027-0>
- Ducic, T., Polle, A., 2005. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 103–112. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100009>
- Edraki, M., Baumgartl, T., Manlapig, E., Bradshaw, D., Franks, D.M., Moran, C.J., 2014. Designing mine tailings for better environmental, social and economic outcomes: a review of alternative

- approaches. *Journal of Cleaner Production* 84, 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.04.079>
- Ent, A. van der, Echevarria, G., Baker, A.J.M., Morel, J.L. (Eds.), 2018. *Agromining: Farming for Metals: Extracting Unconventional Resources Using Plants*, Mineral Resource Reviews. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61899-9>
- Escande, V., Velati, A., Garel, C., Renard, B.-L., Petit, E., Grison, C., 2015. Phytoextracted mining wastes for ecocatalysis: Eco-Mn®, an efficient and eco-friendly plant-based catalyst for reductive amination of ketones. *Green Chem.* 17, 2188–2199. <https://doi.org/10.1039/C4GC02193B>
- Fan, L., Gao, Y., Brück, H., Bernhofer, Ch., 2009. Investigating the relationship between NDVI and LAI in semi-arid grassland in Inner Mongolia using in-situ measurements. *Theor Appl Climatol* 95, 151–156. <https://doi.org/10.1007/s00704-007-0369-2>
- Fernando, D.R., Marshall, A.T., Forster, P.I., Hoebee, S.E., Siegele, R., 2013. Multiple metal accumulation within a manganese-specific genus. *American Journal of Botany* 100, 690–700. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200545>
- Frédette, C., Labrecque, M., Comeau, Y., Brisson, J., 2019. Willows for environmental projects: A literature review of results on evapotranspiration rate and its driving factors across the genus *Salix*. *Journal of Environmental Management* 246, 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.010>
- Gandhi, G.M., Parthiban, S., Thummalu, N., Christy, A., 2015. Ndvi: Vegetation Change Detection Using Remote Sensing and Gis – A Case Study of Vellore District. *Procedia Computer Science* 57, 1199–1210. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.07.415>
- Gessesse, A.A., Melesse, A.M., 2019. Temporal relationships between time series CHIRPS-rainfall estimation and eMODIS-NDVI satellite images in Amhara Region, Ethiopia, in: *Extreme Hydrology and Climate Variability*. Elsevier, pp. 81–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815998-9.00008-7>
- Granier, A., Loustau, D., Bréda, N., 2000. A generic model of forest canopy conductance dependent on climate, soil water availability and leaf area index. *Ann. For. Sci.* 57, 755–765. <https://doi.org/10.1051/forest:2000158>
- Greger, M., 2004. Metal Availability, Uptake, Transport and Accumulation in Plants, in: Prasad, M.N.V. (Ed.), *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–27. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07743-6_1
- Herbette, S., Cochard, H., 2010. Calcium Is a Major Determinant of Xylem Vulnerability to Cavitation. *Plant Physiol.* 153, 1932–1939. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155200>
- Huang, G., Hayes, P.E., Ryan, M.H., Pang, J., Lambers, H., 2017. Peppermint trees shift their phosphorus-acquisition strategy along a strong gradient of plant-available phosphorus by increasing their transpiration at very low phosphorus availability. *Oecologia* 185, 387–400. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3961-x>
- Huang, L., Baumgartl, T., Mulligan, D., 2012. Is rhizosphere remediation sufficient for sustainable revegetation of mine tailings? *Annals of Botany* 110, 223–238. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs115>
- Hunt, E.R., Hively, W.D., Daughtry, C.S.T., McCarty, G.W., Fujikawa, S.J., Ng, T.L., Tranchitella, M., Linden, D.S., Yoel, D.W., Microsystems, I., Drive, T., 2008. REMOTE SENSING OF CROP LEAF AREA INDEX USING UNMANNED AIRBORNE VEHICLES 9. In *ASPRS Pecora 17 Conference Proceeding*, Bethesda, MD: American Society for Photogrammetry and Remote Sensing. <http://www.asprs.org/a/publications/proceedings/pecora17/0018.pdf>.

- Joint Research Centre, 2017. Large-scale physical and chemical land disturbance. [WWW Document]. WAD | World Atlas of Desertification. URL <https://wad.jrc.ec.europa.eu/mining> (accessed 3.22.21).
- Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants, 4th ed. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Kasim, W.A., 2007. Physiological Consequences of Structural and Ultra-structural Changes Induced by Zn Stress in *Phaseolus vulgaris*. II. Enzymes, Amino Acids and Protein Profile. *International Journal of Botany*. <https://doi.org/10.3923/ijb.2007.33.39>
- Khaleghi, A., Naderi, R., Brunetti, C., Maserti, B.E., Salami, S.A., Babalar, M., 2019. Morphological, physiochemical and antioxidant responses of *Maclura pomifera* to drought stress. *Sci Rep* 9, 19250. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55889-y>
- Kiorapostolou, N., Da Sois, L., Petruzzellis, F., Savi, T., Trifilò, P., Nardini, A., Petit, G., 2019. Vulnerability to xylem embolism correlates to wood parenchyma fraction in angiosperms but not in gymnosperms. *Tree Physiology* 39, 1675–1684. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpz068>
- Kitao, M., Lei, T.T., Koike, T., 1997. Comparison of photosynthetic responses to manganese toxicity of deciduous broad-leaved trees in northern Japan. *Environmental Pollution* 97, 113–118. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00064-X)
- Kuzovkina, Y.A., Volk, T.A., 2009. The characterization of willow (*Salix L.*) varieties for use in ecological engineering applications: Co-ordination of structure, function and autecology. *Ecological Engineering* 35, 1178–1189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.03.010>
- Lefsky, M.A., Cohen, W.B., Acker, S.A., Parker, G.G., Spies, T.A., Harding, D., 1999. Lidar Remote Sensing of the Canopy Structure and Biophysical Properties of Douglas-Fir Western Hemlock Forests. *Remote Sensing of Environment* 70, 339–361.
- Levene, H., 1960. Essays in Honor of Harold Hotelling, in: *In Contributions to Probability and Statistics*. Stanford University Press, Palo Alto, CA., pp. 278–292.
- Lin, L., Yu, K., Yao, X., Deng, Y., Hao, Z., Chen, Y., Wu, N., Liu, J., 2021. UAV Based Estimation of Forest Leaf Area Index (LAI) through Oblique Photogrammetry. *Remote Sensing* 13, 803. <https://doi.org/10.3390/rs13040803>
- Lin, Y., 2015. LiDAR: An important tool for next-generation phenotyping technology of high potential for plant phenomics? *Computers and Electronics in Agriculture* 119, 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2015.10.011>
- Loudermilk, E.L., Hiers, J.K., O'Brien, J.J., Mitchell, R.J., Singhanian, A., Fernandez, J.C., Cropper, W.P., Slatton, K.C., 2009. Ground-based LIDAR: a novel approach to quantify fine-scale fuelbed characteristics. *Int. J. Wildland Fire* 18, 676. <https://doi.org/10.1071/WF07138>
- Lu, H., Fan, T., Ghimire, P., Deng, L., 2020. Experimental Evaluation and Consistency Comparison of UAV Multispectral Minisensors. *Remote Sensing* 12, 2542. <https://doi.org/10.3390/rs12162542>
- Luo, S., Wang, C., Pan, F., Xi, X., Li, G., Nie, S., Xia, S., 2015. Estimation of wetland vegetation height and leaf area index using airborne laser scanning data. *Ecological Indicators* 48, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.024>
- Mäkinen, H., 2002. Effect of stand density on the branch development of silver birch (*Betula pendula* Roth) in central Finland. *Trees* 16, 346–353. <https://doi.org/10.1007/s00468-002-0162-x>
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., Blaudez, D., 2009. Metal Accumulation by Woody Species on Contaminated Sites in the North of France. *Water Air Soil Pollut* 204, 89–101. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0029-5>
- Milan, B., 2012. Response of *Salix alba L.* to heavy metals and diesel fuel contamination. *African Journal of Biotechnology* 11. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1004>

- Mirck, J., Volk, T.A., 2009. Seasonal Sap Flow of Four *Salix* Varieties Growing on the Solvay Wastebeds in Syracuse, NY, USA. *International Journal of Phytoremediation* 12, 1–23. <https://doi.org/10.1080/15226510902767098>
- Nowak, D., 1996. Notes: Estimating Leaf Area and Leaf Biomass of Open-Grown Deciduous Urban Trees. *Forest Science* 42, 504–507.
- Page, V., Weisskopf, L., Feller, U., 2006. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytol* 171, 329–341. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01756.x>
- Pajevic, S., Borisev, M., Nikolic, N., Krstic, B., Pilipovic, A., Orlovic, S., 2009. Phytoremediation capacity of poplar (*Populus* spp.) and willow (*Salix* spp.) clones in relation to photosynthesis. *Archives of Biological Sciences* 61, 239–247. <https://doi.org/10.2298/ABS0902239P>
- Pandey, N., Sharma, C.P., 2003. Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environmental and Experimental Botany* 49, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00088-6)
- Pasta, S., de Rigo, D., Caudullo, G., 2016. *Ostrya carpinifolia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats 2.
- Peper, P.J., McPherson, E.G., 1998. Comparison of five methods for estimating leaf area index of open-grown deciduous trees 14.
- QGIS Development Team, 2018. QGIS Geographic Information System: Open Source Geospatial Foundation Project.
- R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rana, G., Katerji, N., 2000. Measurement and estimation of actual evapotranspiration in the field under Mediterranean climate: a review. *European Journal of Agronomy* 13, 125–153. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(00\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(00)00070-8)
- Rauhala, A., Tuomela, A., Davids, C., Rossi, P.M., 2017. UAV Remote Sensing Surveillance of a Mine Tailings Impoundment in Sub-Arctic Conditions. *Remote Sensing* 9, 1318. <https://doi.org/10.3390/rs9121318>
- Robinson, B.H., Green, S.R., Chancerel, B., Mills, T.M., Clothier, B.E., 2007. Poplar for the phytomanagement of boron contaminated sites. *Environmental Pollution* 150, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.017>
- Rüth, B., Lennartz, B., Kahle, P., 2007. Water regime of mechanical—biological pretreated waste materials under fast-growing trees. *Waste Manag Res* 25, 408–416. <https://doi.org/10.1177/0734242X07076940>
- Sadana, U.S., Claassen, N., 2000. Manganese dynamics in the rhizosphere and Mn uptake by different crops evaluated by a mechanistic model. *Plant and Soil* 218, 233–238. <https://doi.org/10.1023/A:1014964107614>
- Scholander, P.F., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A., Hammel, H.T., 1965. Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148, 339–346. <https://doi.org/10.1126/science.148.3668.339>
- Shahmoradi, J., Talebi, E., Roghanchi, P., Hassanalian, M., 2020. A Comprehensive Review of Applications of Drone Technology in the Mining Industry. *Drones* 4, 34. <https://doi.org/10.3390/drones4030034>
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B., 1965. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* 52, 591–611. <https://doi.org/10.2307/2333709>

- Tardella, F.M., Postiglione, N., Tavoloni, M., Catorci, A., 2019. Changes in species and functional composition in the herb layer of sub-Mediterranean *Ostrya carpinifolia* abandoned coppices. *Plant Ecol* 220, 1043–1055. <https://doi.org/10.1007/s11258-019-00973-6>
- Tavanti, R.F.R., David Queiroz, G., Caroline Da Rocha Silva, A., Moya Peres, W., Pereira Paixão, A., Galindo, F.S., Martins Silva, V., Bossolani, J.W., Moreira Melero, M., De Souza Oliveira, G., Furlani Júnior, E., Dos Reis, A.R., 2019. Changes in photosynthesis and antioxidant metabolism of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants in response to manganese stress. *Archives of Agronomy and Soil Science* 1–20. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1637857>
- Tian, J., Wang, L., Li, X., Gong, H., Shi, C., Zhong, R., Liu, X., 2017. Comparison of UAV and WorldView-2 imagery for mapping leaf area index of mangrove forest. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 61, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.jag.2017.05.002>
- Tomasella, M., Casolo, V., Aichner, N., Petruzzellis, F., Savi, T., Trifilò, P., Nardini, A., 2019. Non-structural carbohydrate and hydraulic dynamics during drought and recovery in *Fraxinus ornus* and *Ostrya carpinifolia* saplings. *Plant Physiology and Biochemistry* 145, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.024>
- Tucker, C.J., 1979. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sensing of Environment* 8, 127–150. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(79)90013-0)
- Van Assche, F., Ceulemans, R., Clijsters, H., 1980. Zinc mediated effects on leaf CO₂ diffusion conductances and net photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Photosynthesis Research* 1, 171–180. <https://doi.org/10.1007/BF00020596>
- Vaverková, 2019. Landfill Impacts on the Environment— Review. *Geosciences* 9, 431. <https://doi.org/10.3390/geosciences9100431>
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A., 2007. Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere* 68, 1563–1575. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.052>
- Viana, C.M., Oliveira, S., Oliveira, S.C., Rocha, J., 2019. Land Use/Land Cover Change Detection and Urban Sprawl Analysis, in: *Spatial Modeling in GIS and R for Earth and Environmental Sciences*. Elsevier, pp. 621–651. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815226-3.00029-6>
- Wang, C.-S., Zeng, Ji, Hein, S., Zhao, Z.-G., Guo, J.-J., Zeng, Jie, 2017. Crown and branch attributes of mid-aged *Betula alnoides* plantations in response to planting density. *Scandinavian Journal of Forest Research* 32, 679–687. <https://doi.org/10.1080/02827581.2016.1261936>
- Wang, Y., Fang, H., 2020. Estimation of LAI with the LiDAR Technology: A Review. *Remote Sensing* 12, 3457. <https://doi.org/10.3390/rs12203457>
- Watson, D.J., 1947. Comparative physiological studies on the growth of field crops. *Ann Applied Biology* 40, 1–37. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1953.tb02364.x>
- Wilhelm, W.W., Ruwe, K., Schlemmer, M.R., 2000. Comparison of Three Leaf Area Index Meters in a Corn Canopy. *Crop Science* 40, 1179–1183. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4041179x>
- Xu, X., Shi, J., Chen, Y., Chen, X., Wang, H., Perera, A., 2006. Distribution and mobility of manganese in the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Plant Soil* 285, 323–331. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9018-2>
- Xue, J., Su, B., 2017. Significant Remote Sensing Vegetation Indices: A Review of Developments and Applications. *Journal of Sensors* 2017, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2017/1353691>
- Yao, X., Wang, N., Liu, Y., Cheng, T., Tian, Y., Chen, Q., Zhu, Y., 2017. Estimation of Wheat LAI at Middle to High Levels Using Unmanned Aerial Vehicle Narrowband Multispectral Imagery. *Remote Sensing* 9, 1304. <https://doi.org/10.3390/rs9121304>

- Yang, G., Liu, J., Zhao, C., Li, Z., Huang, Y., Yu, H., Xu, B., Yang, X., Zhu, D., Zhang, X., Zhang, R., Feng, H., Zhao, X., Li, Z., Li, H., Yang, H., 2017. Unmanned Aerial Vehicle Remote Sensing for Field-Based Crop Phenotyping: Current Status and Perspectives. *Front. Plant Sci.* 8, 01111 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01111>.
- Yuan, Y., Ren, Y., Gao, G., Zhao, Z., Niu, S., 2020. Intra- and Interspecific Interactions among Pioneer Trees Affect Forest-Biomass Carbon Accumulation in a Nutrient-Deficient Reclaimed Coal Mine Spoil. *Forests* 11, 819. <https://doi.org/10.3390/f11080819>
- Zapata-Carbonell, J., Bégeot, C., Carry, N., Choulet, F., Delhault, P., Gillet, F., Girardclos, O., Mouly, A., Chalot, M., 2019. Spontaneous ecological recovery of vegetation in a red gypsum landfill: *Betula pendula* dominates after 10 years of inactivity. *Ecological Engineering* 132, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.03.013>
- Zapata-Carbonell, J., Ciadamidaro, L., Parelle, J., Chalot, M., Tatin-Froux, F., 2020. Improving Silver Birch (*Betula pendula*) Growth and Mn Accumulation in Residual Red Gypsum Using Organic Amendments. *Front. Environ. Sci.* 8, 24. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00024>
- Zarco-Tejada, P.J., González-Dugo, V., Berni, J.A.J., 2012. Fluorescence, temperature and narrow-band indices acquired from a UAV platform for water stress detection using a micro-hyperspectral imager and a thermal camera. *Remote Sensing of Environment* 117, 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2011.10.007>
- Zhang, C., Kovacs, J.M., 2012. The application of small unmanned aerial systems for precision agriculture: a review. *Precision Agric* 13, 693–712. <https://doi.org/10.1007/s11119-012-9274-5>
- Zhao, H., Wu, L., Chai, T., Zhang, Y., Tan, J., Ma, S., 2012. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Journal of Plant Physiology* 169, 1243–1252. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.04.016>
- Zhao, Z., Wang, L., Bai, Z., Pan, Z., Wang, Y., 2015. Development of population structure and spatial distribution patterns of a restored forest during 17-year succession (1993–2010) in Pingshuo opencast mine spoil, China. *Environ Monit Assess* 187, 431. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4391-z>

4.3 Chapitre III. Etudier la souche *Pseudomonas sp.*, isolée sur le site d'Ochsenfeld, capable de solubiliser le Mn, et donc faciliter son transfert vers la plante.

4.3.1 Contexte de la publication III

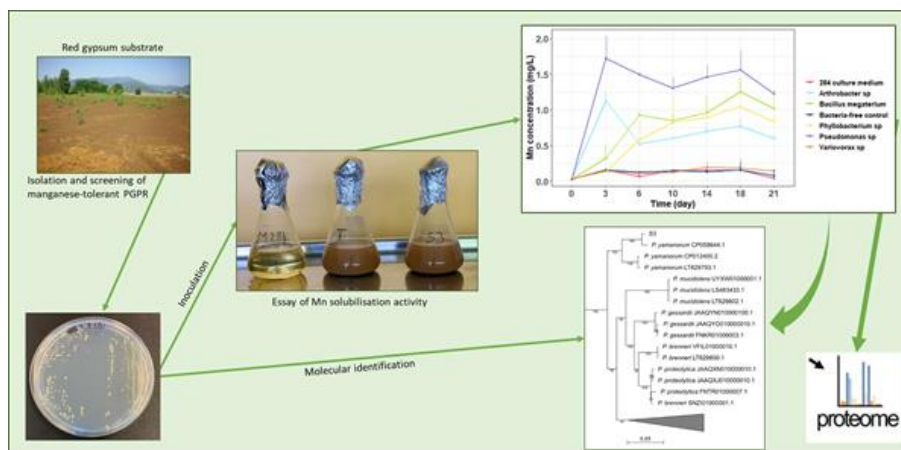
Le gypse rouge du site d'Ochsenfeld présente une teneur élevée en Mn, principalement sous forme d'oxydes non assimilables par les plantes car insoluble. Pourtant des études précédentes ont permis de déterminer de Mn dans les feuilles de bouleau (*Betula pendula*) poussant sur le site. Une autre étude a montré que les sols végétalisés présentent une plus grande diversité bactérienne par rapport aux sols non végétalisés. Donc, nous avons émis l'hypothèse que certaines bactéries qui tolèrent le Mn stimulent la production de biomasse des plantes présentes sur site, et solubilisent le Mn pour faciliter son absorption et son transfert du sol vers la plante.

Dans ce travail, nous avons alors émis l'hypothèse que l'ajout des oxydes de Mn de gypse rouge dans un milieu de culture aurait un impact sur les mécanismes moléculaires de l'isolat bactérien solubilisant ce Mn. Les objectifs étaient donc de (i) déterminer l'isolat qui avait la plus haute capacité de solubilisation de Mn parmi 5 PGPR isolés du terril de gypse rouge, (ii) caractériser le génome de cet isolat, et (iii) investiguer son protéome lors de l'exposition au Mn. Ce chapitre est en cours de finalisation, car une partie des résultats (la protéogénomique) n'a pas encore été analysée. L'analyse génomique a été réalisée avec l'aide de Dr Benoit Valot (Laboratoire Chrono-environnement) et la protéomique en collaboration avec Dr Jean Armengaud (CEA Saclay).

Titre : Aperçu protéogénomique d'un isolat de *Pseudomonas sp* à haute capacité de solubilisation de manganèse, isolée d'un terril de gypse rouge.

Statut : *En préparation*

Eléments essentiels : - La capacité de solubilisation de Mn des 5 PGPR isolés du gypse rouge a été évaluée. - *Pseudomonas sp* est l'isolat ayant la plus haute capacité de solubilisation de Mn. - Il était très lié phylogéniquement au *P. yamanorum*. - Son protéome en présence de Mn sera déterminé.



Résumé :

Les bactéries associées aux plantes peuvent modifier la solubilité, la disponibilité et la mobilité des éléments traces métalliques notamment le manganèse (Mn) dans le sol. Dans cette présente étude, l'objectif était de déterminer l'isolat ayant la plus haute capacité de solubilisation de Mn parmi 5 PGPR isolés du terril de gypse rouge d'Ochsenfeld, décrire son génome complet, et investiguer son protéome lors de l'exposition au Mn. Les sources de Mn utilisées étaient : le gypse rouge, le $MnCO_3$ et le Mn_3O_4 . Les réponses moléculaires de l'isolat ayant la plus grande activité de solubilisation de Mn via des approches protéogénomiques ont été étudiés. L'isolat S3 *Pseudomonas sp* avait la grande capacité de solubilisation de Mn parmi les 5 isolats étudiés. Ce processus de solubilisation du Mn, également connu sous le nom de voie de réduction dissimilatrice de Mn, permet aux formes oxydées Mn(IV) de jouer le rôle d'accepteurs terminaux d'électrons. Le génome de l'isolat *Pseudomonas sp* proche phylogénétiquement de *P. yamanorum*, consiste en un seul chromosome circulaire de 6.886.256 paires de bases et contient 6.094 gènes codant pour des protéines. L'analyse du protéome encours devrait permettre à identifier les protéines spécifiques impliquées dans la solubilisation de Mn.

4.3.2 Publication III

Proteogenomics insights of a high manganese-solubilisation capacity *Pseudomonas sp* isolate from a red gypsum landfill

**Abdoulaye Mahamat Malabad ^a, Stephane Pfendler ^a, Jean Armengaud ^b, Benoit Valot^a,
Michel Chalot ^{a,c*}**

^a Chrono-environnement UMR6249, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000, Besançon, France

^b CEA Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, F-30200 Bagnols-sur-Cèze, France

^c Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, 54000 Nancy, France

* Corresponding author at: Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pôle Universitaire du Pays de Montbéliard, 4 Place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard, France.

E-mail address: michel.chalot@univ-fcomte.fr (M. Chalot).

Summary:

Plant-associated bacteria can modify the solubility, availability and mobility of trace elements including manganese (Mn) in soil. In this present study, the objective was to determine the isolate with the highest Mn-solubilisation capacity among five plant growth-promoting rhizobacteria isolated from the Ochsenfeld red gypsum landfill, describe its complete genome, and investigate its proteome upon Mn exposure. The sources of Mn used were red gypsum, MnCO_3 and Mn_3O_4 . The molecular responses of the isolate with the highest Mn-solubilisation activity via proteogenomic approaches were studied. The S3 isolate *Pseudomonas sp* had the highest Mn-solubilisation capacity among the five isolates studied. This process of Mn-solubilisation, also known as the dissimilatory Mn-reduction pathway, allowed the oxidized Mn(IV) forms to act as terminal electron acceptors. The genome of the *Pseudomonas sp* isolate, phylogenetically related to *P. yamanorum*, consists of a single circular chromosome of 6,886,256 base pairs and contains 6,094 protein-coding genes. The analysis of the proteome should help to identify specific proteins involved in Mn-solubilisation.

Keywords:

Manganese solubilisation, Manganese reduction, *Pseudomonas sp*, Complete genome sequence, Proteomics.

III.1. Introduction

The mining and industrial anthropogenic activities have a strong impact on the environment, by emitting contaminants into the air, water and soil, the main ones being hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, and trace elements (TE), which can persist in the environment (Zhuang *et al.*, 2007). TE occur naturally in the environment at low concentrations. However, at high concentrations and in certain chemical forms, they are considered to be pollutants (He *et al.*, 2005). New technological advances have been introduced for the management of polluted sites and soils. Today, the techniques used to treat polluted sites and soils include physical treatment, chemical remediation, and bioremediation. The first two techniques are effective and relevant on a small scale, but have significant drawbacks: expensive techniques, low yield, and soil depletion (Wang *et al.*, 2017). These means of soil remediation are also problematic for soil microbial diversity. It is therefore necessary to develop environmentally friendly tools and techniques, such as phytomanagement, which allows to maintain and restore the microbiome (Rajkumar *et al.*, 2012). In TE-contaminated soils, bacteria are the first to react to TE, and therefore bacterial metabolisms can be at the origin of transformations or speciation changes of TE (Bolan *et al.*, 2013). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have developed numerous resistances against TE. Among the resistance mechanisms, there are specific or broad-spectrum transporters, oxidases or reductases that transform a TE into a volatile or less toxic compound (Ullah *et al.*, 2015).

PGPR can also impact the mobility of TE, in particular Mn, in soils through solubilisation, which is an important issue for the Mn-extraction by plants. Indeed, Mn is an important micronutrient for plant growth and development. It is a necessary component for the functioning of arginase, a key enzyme for maintaining the essential level of nitrogen (N) in the plant (Siddappa *et al.*, 2018). It has a role of activator and cofactor of various enzymes such as Mn-superoxide dismutase, Mn-catalase, pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. Therefore, the incorporation of Mn by cells is essential, especially for photosynthesis and redox reactions. It also assists in chlorophyll synthesis and nitrate assimilation, and it is involved in the formation of riboflavin, ascorbic acid, and carotene (Ducic and Polle, 2005).

The Mn-solubilisation by the bacterial route can be achieved by acidification causing secretion of protons and/or organic anions, by chelation inducing ion exchange (DalCorso *et al.*, 2019), and/or by reduction of Mn oxides (Johnson and Pakostova, 2021). In the absence of

oxygen, the oxidised forms of Mn(IV) can act as electron acceptors to allow the oxidation, by bacterial route, of various biodegradable organic materials (carbohydrates, organic acids, etc.). This process, known as dissimilatory reduction, leads to the solubilisation of Mn oxides, following a simultaneous lowering of Eh and pH, and to the appearance of reduced Mn²⁺ ions (Lovley, 1993). As the Mn(IV) electron acceptor is highly insoluble in most neutral pH environments, there is therefore a significant challenge for Mn(IV)-reducing bacteria to develop strategies for electron transfer to an extracellular terminal electron acceptor (Lecomte *et al.*, 2018). Therefore, dissimilatory metal-reducing microorganisms (DMRM) need to transfer electrons from central metabolism to a reduction site outside the inner membrane and express a reductase located on the outer membrane to reduce Mn(IV) oxides to Mn(II) (Lovley *et al.*, 2004). These reactions have been widely studied on the *Shewanella oneidensis* MR-1 (Beliaev *et al.*, 2005; Bretschger *et al.*, 2007) and *S. putrefaciens* MR-1 (Myers and Myers, 2001; DiChristina *et al.*, 2002) models. However, to our knowledge, no studies have been carried out on PGPR as models. In *Shewanella sp.*, *mtrA*, *mtrB*, *mtrC*, *omcA*, *omcB* and *cymA* genes seem to be involved in Mn-solubilisation by reduction of Mn(IV) oxides. MtrABC serves as an electron conduit between the periplasm and extracellular environments (Hartshorne *et al.*, 2009). MtrC, *omcB* and *omcA* encode decaheme c-type cytochromes that serve as terminal Mn(IV) reductases (Bretschger *et al.*, 2007). *CymA*, a tetraheme c-type cytochrome bound to the cytoplasmic membrane, is involved in electron flow during Mn(IV) reduction (Myers and Myers, 1997).

The flexibility of bacteria to use Mn(IV) as an alternative terminal electron acceptor contributes to the ability of bacteria to colonise rhizospheres, which is a fundamental characteristic of environmental and ecological adaptation. At the Ochsenfeld red gypsum landfill, it was found that vegetated soils have a higher bacterial diversity than non-vegetated soils (Zappellini *et al.*, 2018). On the one hand, some of the bacteria are found to have a high Mn-tolerance and stimulate the biomass production of the plants present on site. Birch trees (*Betula pendula*) have naturally colonised the site, after 10 years of inactivity (Zapata-Carbonell *et al.*, 2019), even though the agronomic conditions are unfavourable to plant growth (very high pH ranging from 8 to 12, low N content, and very high Mn content) (Assad *et al.*, 2017). The birch trees are also enriched in Mn (Ciadamidaro *et al.*, 2019; Malabad *et al.*, 2022), although the extractable fraction of Mn, which is therefore soluble and bioavailable for the plant, is negligible (<0.1%) (Zapata-Carbonell *et al.*, 2019). We then believe that Mn, which is in the form of oxides and therefore cannot be assimilated by the plant because it is insoluble (Wang

et al., 2009), is transformed into soluble Mn form by rhizobacteria on the site. They could therefore constitute good candidates for the solubilisation of Mn and ultimately allow its phytoextraction. Thus, a phytomanagement project including Mn-tolerant and Mn-solubilising PGPR could allow the production of Mn-enriched biomass that could be recovered, for example, through the ecocatalysis sector (Grison, 2015).

Therefore, in order to understand the roles of bacteria on Mn transfer mechanisms in the soil-plant continuum, we hypothesised that the presence of red gypsum Mn oxides in a culture medium would have an impact on the molecular mechanisms of the Mn-solubilising bacterial isolate. The objectives were thus to (i) determine the isolate which had the highest Mn-solubilisation capacity among five PGPR isolated from the Ochsenfeld red gypsum landfill, (ii) characterise its complete genome, and (iii) investigate its proteome upon exposure to Mn.

III.2. Experimental procedures

2.1. Sampling

The first source of Mn used in this study is a substrate commonly known as red gypsum, a by-product of TiO₂ extraction. It comes from the Ochsenfeld landfill located in Alsace, France (lat. 47° 47' 47.6124" N - long. 7° 8' 18.6498" E). The characterisation of red gypsum has been detailed in several previous studies (Assad *et al.*, 2017; Zapata-Carbonell *et al.*, 2019). Briefly, the red gypsum substrates have an average pH of 8.3 ± 1.1 . The total Mn content and CaCl₂ extractable fraction of the red gypsum is 4938 ± 483 mg/kg DM and 0.2 ± 0.02 mg/kg DM respectively. The samples were sterilised by three series of autoclave at 120 °C for 20 min with intervals of 2 days between each series.

2.2. Microorganisms

The different isolates used in this present study (Table 1) are PGPR previously isolated from the Ochsenfeld site, identified by 16S DNA gene sequencing and characterised as PGPR (Zappelini *et al.*, 2018). Aseptic techniques were used for handling and inoculating the culture. The bacterial concentrations used were 10⁸ CFU/ml obtained by the reference method (CFU/ml).

Table 1

Characterisation of plant growth-promoting and Mn-tolerance of five rhizobacterial isolates from the Ochsenfeld red gypsum site (Zappelini, et al., 2018). The parameters are auxin production (IAA), organic acid production (OA), phosphate-solubilisation (P) and siderophore production (SID). Mn-tolerance was tested on Mn from 5 to 25 mM MnSO₄.H₂O.

Isolats	ID	IAA	OA	P	SID	Mn 5mM	Mn 10mM	Mn 25mM
<i>Arthrobacter sp</i>	S1	-	-	-	+	+	+	-
<i>Bacillus megaterium</i>	S2	-	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas sp</i>	S3	-	-	+	+	+	+	+
<i>Phyllobacterium sp</i>	S4	+	-	+	-	+	+	+
<i>Variovorax sp</i>	S5	+	+	-	-	+	-	-

2.3. Assay for manganese-solubilisation activities and pH analyses

The different isolates were individually inoculated at 10% (v/v) in 150 ml of 284 culture medium (Schlegel *et al.*, 1961) supplemented with 2% (w/v) of red gypsum as a source of Mn in 500 ml Erlenmeyer flasks (Fig. 1) and placed in an incubator at 25° C under continuous shaking conditions (150 rpm) for 21 days. All experiments were performed in three replicates with an initial pH of 8.5. This protocol was adopted from (Ghosh and Das, 2018). Two control treatments without any isolates were retained, the first of which contained only the 284-culture medium and the second was supplemented with 2% (w/v) of red gypsum. Aliquots of 5 ml were collected every third day and centrifuged at 10,000 rpm. The supernatants were collected and filtered using 0.22 µm filters and then analysed. The Mn doses and pH values of the medium were measured by an atomic absorption spectrometer (AAS) (Model AA-240 FS, Varian, Palo Alto, US) and a pH meter (Model 225 Denver Instrument Company, Colorado, US) respectively. The Mn-solubilisation rate was calculated according to the following formula $(C_f - C_0) / C_0$ where C_0 and C_f are the initial and final concentrations of Mn in the solution respectively.

To test the effect of pH in Mn solubilisation, uninoculated culture media containing red gypsum were acidified with 0.25% and 0.5% HCl (v/v). Aliquots of 5 ml were removed and analysed by AAS every day for 6 days. To compare the quantitative methods in 284 liquid culture medium and qualitative in solid culture medium, the Mn-solubilisation with two artificial substrates 10 mM MnCO₃ and 10 mM Mn₃O₄ was tested on Pikovskaya solid culture medium in a Petri dish. MnCO₃ and Mn₃O₄ render the agar opaque, thus the Mn-solubilisation

is evidenced by the appearance of a translucent halo that forms around the colonies upon solubilising activity. The Petri dishes were incubated at 25°C for 21 days and halos were measured every 3 days.



Fig. 1. Photos of the Erlenmeyer flasks used in the study of Mn-solubilisation. A. Erlenmeyer flasks containing only 284 culture medium, B. Erlenmeyer flasks containing 284 culture medium and sterilised red gypsum, C. Erlenmeyer flasks containing 284 culture medium, sterilised red gypsum, and bacterial culture.

2.4. Genome sequences analysis

Among the five isolates studied, the genome of that with the highest Mn-solubilisation capacity was completely sequenced, for genomic study. The protocol used for sample preparation was as follows: genomic DNA was extracted by mechanical and chemical cell lysis, by grinding steps and the addition of chemical agents (1M extraction solution composed of 10 mL Tris, 1.86 g KCl, 0.37 g EDTA, and 1 M NaOH). The extracted DNA was sent to the Microsynth sequencing platform which had performed two PCR, purification of the PCR products, and sequencing by a Sanger 3130 sequencer. Genome assembly and annotation was performed using automated pipelines from the Galaxy online platform (<https://usegalaxy.org/>). Functional annotation of the identified genes was performed by sequence similarity search against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database by BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To see the relationship of this isolate with the closest strains, a phylogenetic tree was constructed using the 498 representative genomes of the different species with a sampling of 3 strains per species by the MLSA (MultiLocus Sequencing Analysis) technique, using Itols. A Bayesian approach using MrBayes software (<http://nbiSweden.github.io/MrBayes/>) with a GTR+G model was used.

2.5. Proteomics analysis

The highest Mn-solubilisation capacity isolate was grown in 284-medium supplemented with 2% red gypsum (w/v) as mentioned in section 2.3, at 1 and 3 days. Cells were harvested by centrifugation at 5,000 rpm for 10 min at room temperature. The cell pellets were washed three times with 284 culture medium and flash frozen. The detailed protein extraction protocol was given by (Grosjean *et al.*, 2022). The experiment was carried out at t=1 and t=3 days in 5 replicates for each of the three treatments, namely: isolate + 284 culture medium, isolate + 284 culture medium + red gypsum, and isolate + 284 culture medium + red gypsum + 2.5% HCl (v/v).

III.3. Results and discussion

3.1. Manganese-solubilisation efficiency

There is a significant difference in Mn solubilisation capacity between the isolates tested, particularly for S3 *Pseudomonas sp*, which from the 3rd day of incubation had solubilised Mn in the solution on average 1.72 mg/l (Fig. 2), corresponding to a solubilisation rate of 51% (Fig. 3). Throughout the experiment, this S3 isolate remained the most efficient compared to the others, so it seems to be the best candidate for the solubilisation of Mn oxides present in red gypsum. The high Mn content on the 3rd day compared to the other days could be attributed to the exponential growth phase of this isolate which continues to multiply until the 6th day (Fig. S1). On the 3rd day, *Arthrobacter sp* isolate had yielded 1.13 mg/l of Mn in the solution, however over time the Mn content in the solution had decreased approximately 2-fold. The Mn-solubilisation obtained with the *Variovorax sp* isolate was 11 times lower than that obtained with *Pseudomonas sp*, making *Variovorax sp* the least efficient of the five isolates studied. The Mn content produced in the control fasls over time remained stable and close to zero (Fig. 2).

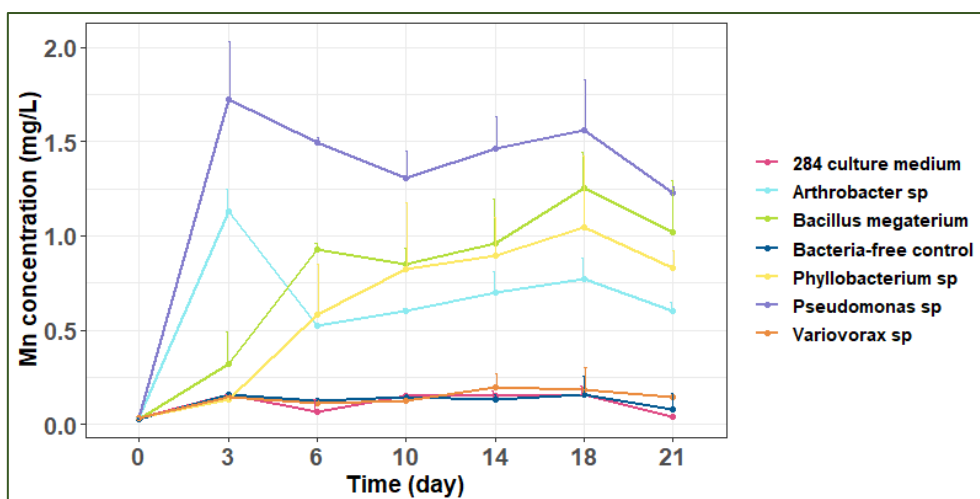


Fig. 2. Mn-solubilisation capacity over time of the five isolates individually inoculated at T0 with a concentration of 10^8 CFU/ml in 150 ml of 284 liquid medium containing 3 g sterile red gypsum. The mean of three replicates is shown, along with the associated standard deviation. Aliquots of 5 ml were analysed by SAA (atomisation by oven) giving the Mn-concentration in mg/l.

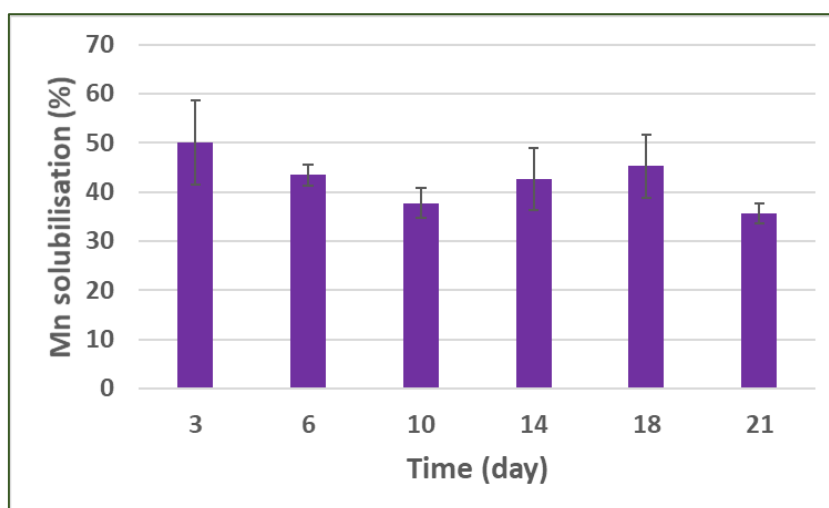


Fig. 3. Mn-solubilisation rate of red gypsum over time by the highest Mn-solubilisation capacity *Pseudomonas sp* isolate, from red gypsum landfill.

As in the case of 284 liquid medium supplemented with red gypsum, the *Pseudomonas* S3 isolate was the most efficient isolate of the 5 isolates studied on solid Pikovskaya medium (Fig. S2). With $MnCO_3$, from the 3rd day of culture, the S3 isolate produced the specific halo indicating the Mn-solubilisation capacity of the strain. On the 21st day of culture, the halo occupied 3/4 of the Petri dish. Two weeks after the start of the experiment, the *Arthrobacter sp* and *Bacillus megaterium* isolates had shown a slight capacity to solubilise Mn, which was confirmed on the 21st day. They were therefore intermediate isolates as in the liquid medium, whereas the *Variovorax sp* isolate was the least effective of the five isolates studied. With

Mn₃O₄ as the sole source of Mn oxide, solubilisation by the S3 *Pseudomonas sp* isolate started to take place 18 days after the start of the incubation. These set of data from the experiment conducted on a solid medium with artificial Mn oxide sources (Fig. S2) confirmed the results obtained on the liquid medium (Fig. 2).

After 21 days of incubation, the pH of the solution inoculated with the *Pseudomonas S3* isolate dropped significantly by one unit, whereas the pH of the control solutions which did not change during the experiment (Fig. 4). Therefore Mn-availability had increased with decreasing soil pH, as demonstrated earlier (Marschner *et al.*, 1986). The *Variovorax sp* isolate, which did not solubilised Mn, had the highest pH values among the five isolates studied. This suggests that the solubilisation of Mn oxides by the *Pseudomonas S3* is primarily involving acidification mechanisms.

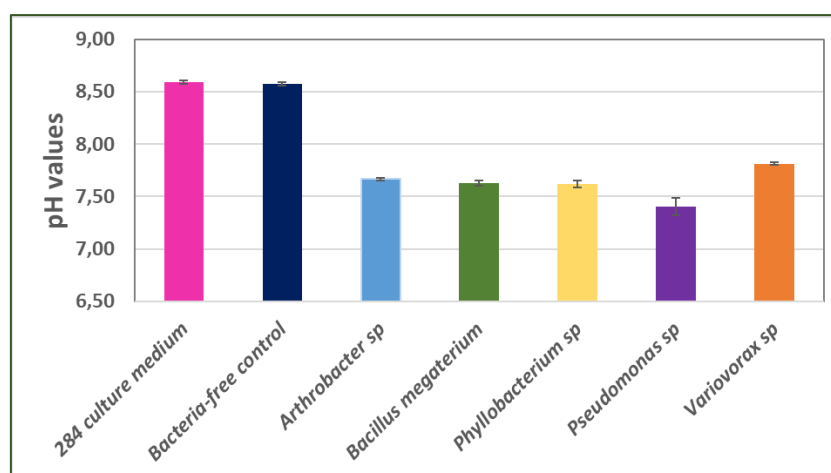


Fig. 4. pH values of the control (284 culture medium and bacteria-free control), and different solutions (150 ml of 284 liquid medium containing 3 g sterile red gypsum) containing each of the five isolates studied at t=21 days, analysed by pH-meter. The mean of three replicates is shown, along with the associated standard deviation.

This potential relationship between the acidity of the solution and the Mn content had led us to test the effect of pH in the Mn-solubilisation, by directly and artificially acidifying with HCl the 284 culture media containing red gypsum (Fig. 5). It was confirmed that the highest Mn-solubilisation (2-3 mg/l) was observed under low pH conditions (treatment with 0.5% HCl). An average solubilisation of 0.5 mg/l was measured in the solution acidified with 0.25% HCl. The non-acidified solutions were the treatments which had a Mn content close to zero.

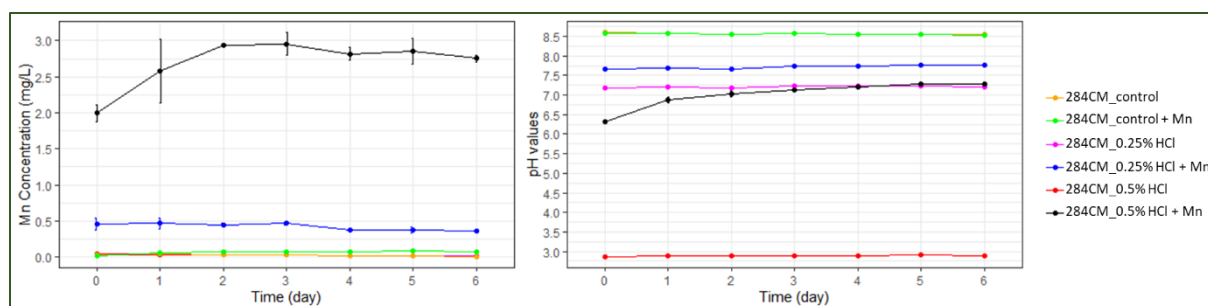


Fig. 5. Test of the effect of pH in the Mn-solubilisation over time. 284CM is the abbreviation for 284 culture medium. The 2 controls were not acidified by the addition of HCl. The Mn source used was red gypsum (2% w/v).

3.2. General genome features of a high manganese-solubilisation capacity *Pseudomonas sp* isolate

To fully understand the mechanisms involved in the solubilization of Mn-oxides by bacteria, we further sequenced the genome of the *Pseudomonas* S3 isolate, as a first step towards the elucidation of molecular mechanisms involved.

The main characteristics of the *Pseudomonas sp* genome are listed in Table 2. The genome consisted of a single circular chromosome of 6,886,256 base pairs with a GC content of 59.12%. The genome contains 6,094 coding DNA sequence (CDS), 55 tRNA, 4 ncRNA, 3 rRNA (5S, 16S and 23S) and 163 Pseudogenes. A phylogenetic tree was constructed from 498 representative genomes of the different species of the genus *Pseudomonas*, which shown that the S3 isolate with high Mn-solubilisation capacity belong to the *P. fluorescens* group and was most closely related to *P. yamanorum* with nearly 100% similarity (Fig. 6). The *P. yamanorum* strain is a bacterium previously isolated from a subantarctic environment in Ushuaia, Argentina (Arnau *et al.*, 2015), from a soil sample left under snow for a period of about 6 months in Erzurum, Turkey (Komesli *et al.*, 2020) and finally from *Agaricus bisporus* capsules sampled on farms in the Netherlands, the UK and Belgium (Taparia *et al.*, 2020). We then explored the genome of the *Pseudomonas* S3 isolate to retrieve genes known as being involved in Mn oxide reduction, using BLAST analysis. However, the genes involved in Mn-solubilisation identified in *S. putrefaciens* and *S. oneidensis*, namely *mtrA*, *mtrB*, *mtrC*, *omcA*, *omcB* and *cymA*, were not detected in the genome of the *Pseudomonas* S3 isolate. It would be necessary to look for bacterial genes that are induced by acidification.

We further designed an experiment to decipher changes in proteome profiles. This ongoing experiment should allow us to more precisely describe the cellular mechanisms involved in the solubilization of Mn oxides by the *Pseudomonas* S3 isolate.

Table 2

General features of a high Mn-solubilisation capacity *Pseudomonas* sp isolate genome, from a red gypsum landfill.

Number of contigs	202
Genome size (base pairs)	6,886,256
G+C content (percent)	59.12%
Genes (total)	6,319
CDS (total)	6,257
Genes (coding)	6,094
CDS (with protein)	6,094
Genes (RNA)	62
rRNA	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)
complete rRNA	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)
tRNA	55
ncRNA	4
Pseudo Genes (total)	163
CDSs (without protein)	163
Pseudogenes (ambiguous residues)	0 of 163
Pseudogenes (frameshifted)	66 of 163
Pseudogenes (incomplete)	117 of 163
Pseudogenes (internal stop)	25 of 163
Pseudogenes (multiple problems)	40 of 163

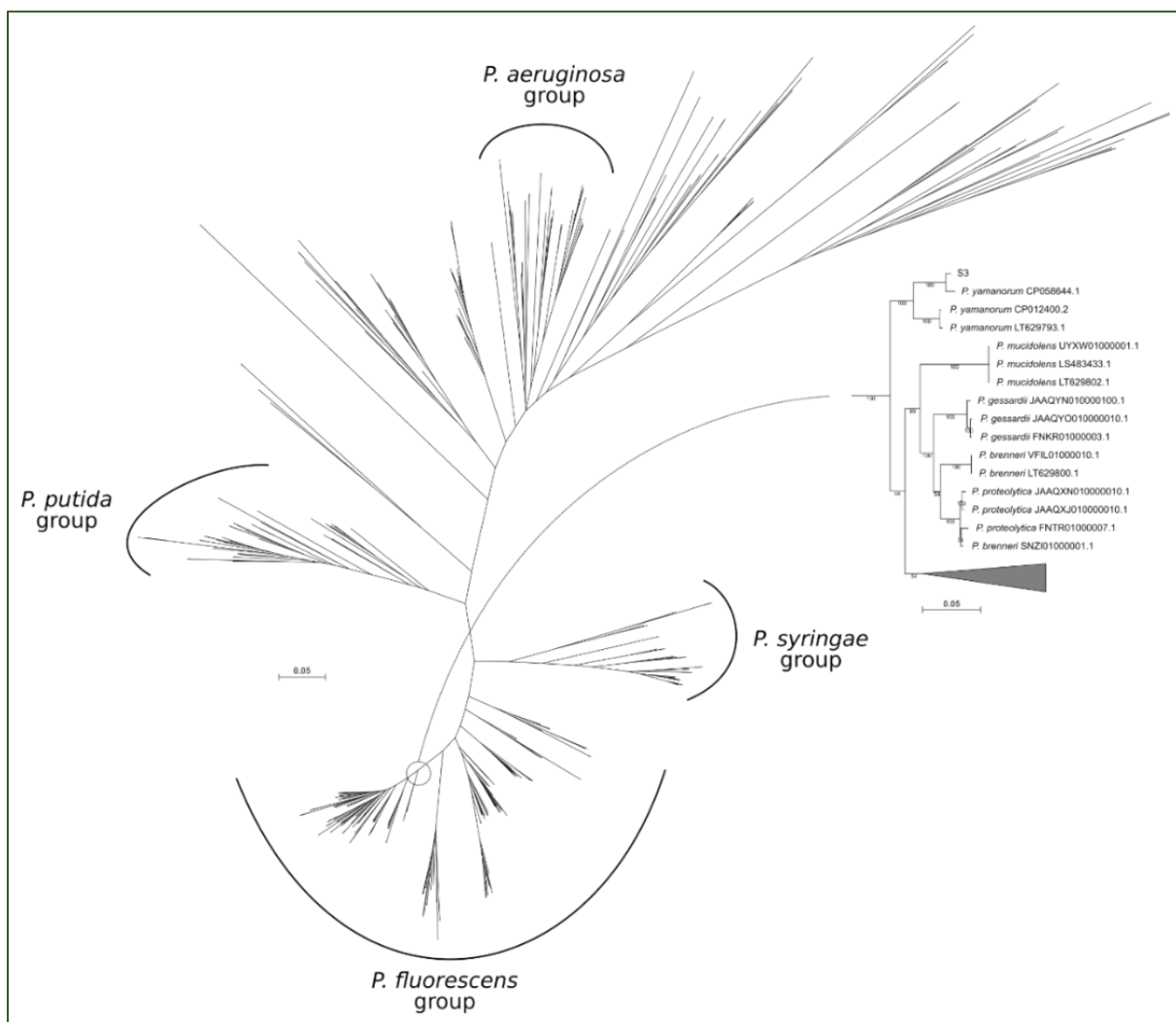


Fig. 6. Phylogenetic tree showing the position of high Mn-solubilisation capacity S3 isolate related to *Pseudomonas*. The tree was constructed from 498 representative genomes of the different species of the genus *Pseudomonas* with a sampling of 3 strains per species by the MLSA (MultiLocus Sequencing Analysis) technique, using Itols, by a Bayesian approach of MrBayes software (<http://nbisweden.github.io/MrBayes/>) with a GTR+G model.

CRediT authorship contribution statement

Abdoulaye Mahamat Malabad: Conceptualization, Investigation, Writing – original draft. **Stéphane Pfendler:** Investigation, Writing – original draft. **Jean Armengaud:** Proteomics data acquisition and analysis. **Benoit Valot:** Genomics data curation and analysis. **Michel Chalot:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Marie-Laure Toussaint of the PEAT² platform for her help in the Mn analyses. We thank Jean Michel Colin (Tronox, France) for providing us with access to red gypsum substrate from Ochsenfeld site. This work was supported by the French National Research Agency [PHYTOCHEM ANR-13-CDII-0005-01] and the French Environment and Energy Management Agency [PROLIPHYT ADEME- 1172C0053].

Appendix A. Supporting information

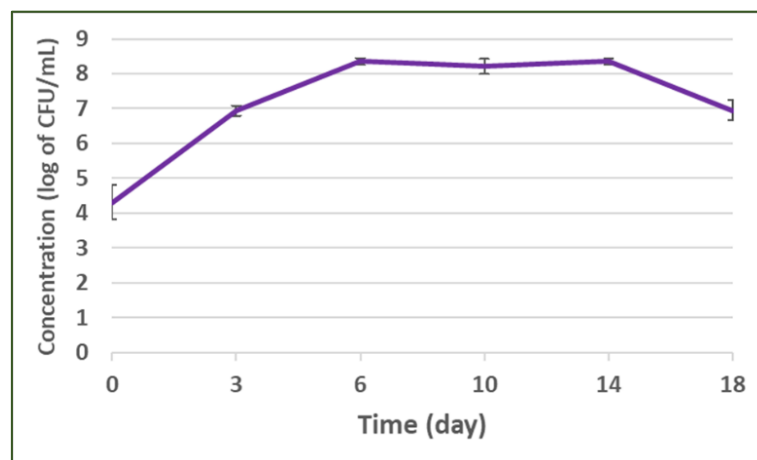


Fig. S1. Monitoring of the growth of *Pseudomonas sp* isolate, on 284 liquid medium supplemented with red gypsum source of Mn (n=3).

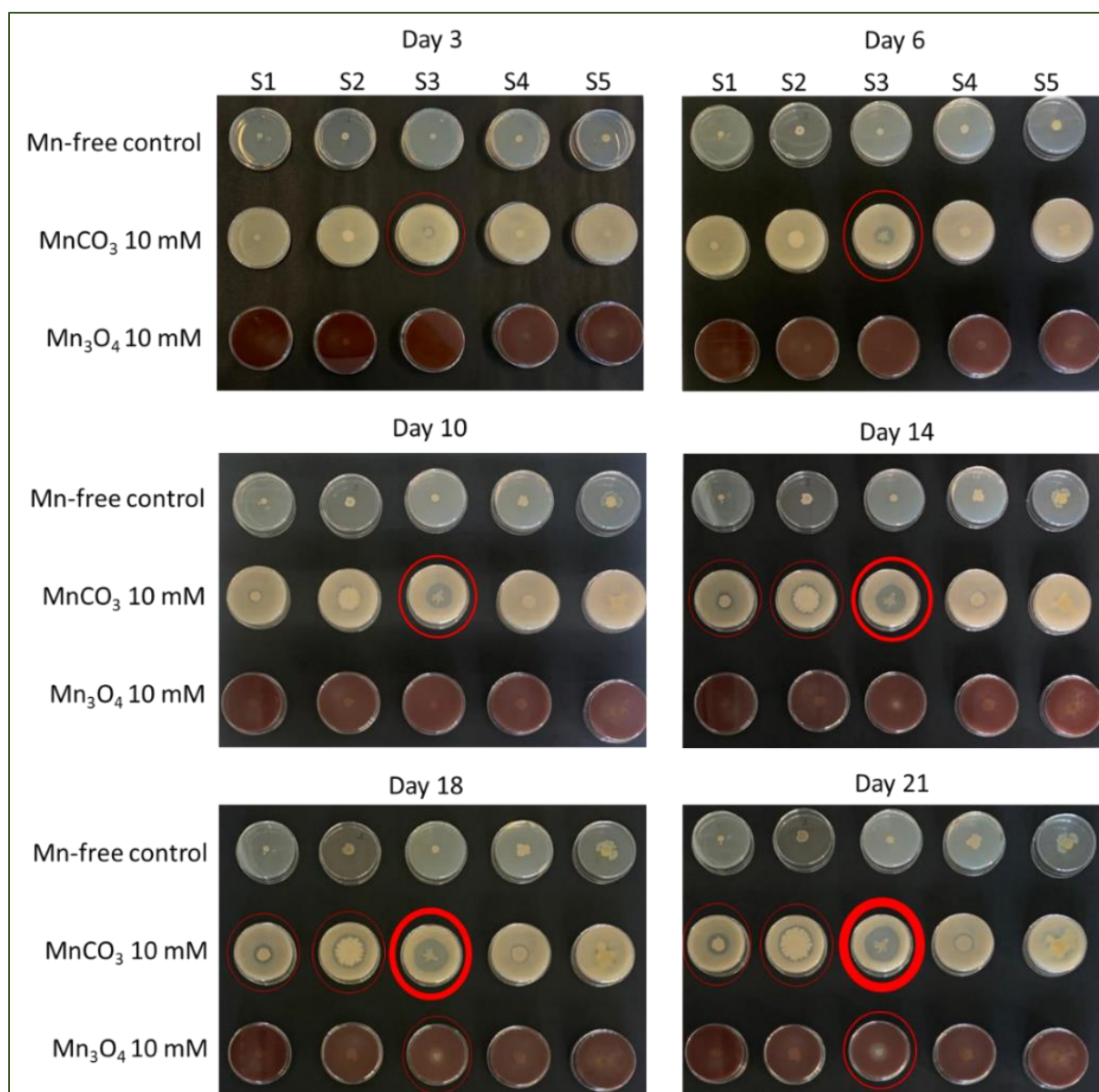


Fig. S2. Mn-solubilisation test over time by isolates S1: *Arthrobacter sp*, S2: *Bacillus megaterium*, S3: *Pseudomonas sp*, S4: *Phyllobacterium sp*, and S5: *Variovorax sp*, on Pikovskaya solid medium in three modalities: Mn-free control, 10 mM MnCO₃ and 10 mM Mn₃O₄. Red circled halos showing Mn-solubilisation by reduction.

References

- Arnau, V.G., Sánchez, L.A., and Delgado, O.D. 2015 (2015) *Pseudomonas yamanorum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a subantarctic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**: 424–431.
- Assad, M., Tatin-Froux, F., Blaudez, D., Chalot, M., and Parelle, J. (2017) Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill. *Environ Sci Pollut Res* **24**: 5019–5031.
- Beliaev, A.S., Klingeman, D.M., Klappenbach, J.A., Wu, L., Romine, M.F., Tiedje, J.M., et al. (2005) Global Transcriptome Analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 Exposed to Different Terminal Electron Acceptors. *Journal of Bacteriology* **187**: 7138–7145.
- Bolan, N.S., Choppala, G., Kunhikrishnan, A., Park, J., and Naidu, R. (2013) Microbial Transformation of Trace Elements in Soils in Relation to Bioavailability and Remediation. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Whitacre, D.M. (ed). New York, NY: Springer, pp. 1–56.
- Bretschger, O., Obratsova, A., Sturm, C.A., Chang, I.S., Gorby, Y.A., Reed, S.B., et al. (2007) Current Production and Metal Oxide Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 Wild Type and Mutants. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7003–7012.
- Ciadamidaro, L., Parelle, J., Tatin-Froux, F., Moyon, C., Durand, A., Zappelini, C., et al. (2019) Early screening of new accumulating versus non-accumulating tree species for the phytomanagement of marginal lands. *Ecological Engineering* **130**: 147–156.
- DalCorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G., and Furini, A. (2019) Heavy Metal Pollutions: State of the Art and Innovation in Phytoremediation. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 3412.
- DiChristina, T.J., Moore, C.M., and Haller, C.A. (2002) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction by *Shewanella putrefaciens* Requires *ferE*, a Homolog of the *pulE* (*gspE*) Type II Protein Secretion Gene. *Journal of Bacteriology* **184**: 142–151.
- Ducic, T. and Polle, A. (2005) Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Braz J Plant Physiol* **17**: 103–112.
- Ghosh, S. and Das, A.P. (2018) Metagenomic insights into the microbial diversity in manganese-contaminated mine tailings and their role in biogeochemical cycling of manganese. *Sci Rep* **8**: 8257.
- Grisson, C., 2015. Combining phytoextraction and ecocatalysis: a novel concept for greener chemistry, an opportunity for remediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 5589–5591. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3169-0>
- Grosjean, N., Le Jean, M., Armengaud, J., Schikora, A., Chalot, M., Gross, E.M., and Blaudez, D. (2022) Combined omics approaches reveal distinct responses between light and heavy rare earth elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials* **425**: 127830.
- Hartshorne, R.S., Reardon, C.L., Ross, D., Nuester, J., Clarke, T.A., Gates, A.J., et al. (2009) Characterization of an electron conduit between bacteria and the extracellular environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 22169–22174.
- He, Z.L., Yang, X.E., and Stoffella, P.J. (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **19**: 125–140.
- Johnson, D.B. and Pakostova, E. (2021) Dissolution of Manganese (IV) Oxide Mediated by Acidophilic Bacteria, and Demonstration That Manganese (IV) Can Act as Both a Direct and Indirect Electron Acceptor for Iron-Reducing *Acidithiobacillus* spp. *Geomicrobiology Journal* **38**: 570–576.

- Komesli, S., Akbulut, S., Arslan, N.P., Adiguzel, A., and Taskin, M. (2020) Waste frying oil hydrolysis and lipase production by cold-adapted *Pseudomonas yamanorum* LP2 under non-sterile culture conditions. *Environmental Technology* **42**: 3245–3253.
- Lecomte, S.M., Achouak, W., Abrouk, D., Heulin, T., Nesme, X., and Haichar, F. el Z. (2018) Diversifying Anaerobic Respiration Strategies to Compete in the Rhizosphere. *Front Environ Sci* **6**: 139.
- Lovley, D.R. (1993) Dissimilatory metal reduction. *Annu Rev Microbiol* **47**: 263–290.
- Lovley, D.R., Holmes, D.E., and Nevin, K.P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microb Physiol* **49**: 219–286.
- Malabad, A.M., Tatin-Froux, F., Gallinet, G., Colin, J.-M., Chalot, M., and Parelle, J. (2022) A combined approach utilizing UAV 3D imaging methods, in-situ measurements, and laboratory experiments to assess water evaporation and trace element uptake by tree species growing in a red gypsum landfill. *Journal of Hazardous Materials* **425**: 127977.
- Marschner, H., Römheld, V., Horst, W.J., and Martin, P. (1986) Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **149**: 441–456.
- Myers, C.R. and Myers, J.M. (1997) Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome *c* required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol* **179**: 1143–1152.
- Myers, J.M. and Myers, C.R. (2001) Role for Outer Membrane Cytochromes *OmcA* and *OmcB* of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in Reduction of Manganese Dioxide. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 260–269.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., and Freitas, H. (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* **30**: 1562–1574.
- Schlegel, H.G., Gottschalk, G., and Bartha, R.V. (1961) FORMATION AND UTILIZATION OF POLY- γ -HYDROXYBUTYRIC ACID BY KNALLGAS BACTERIA (HYDROGENOMONAS). 3.
- Siddappa, S., Basrur, V., Ravishankar Rai, V., and Marathe, G.K. (2018) Biochemical and functional characterization of an atypical plant l-arginase from Cilantro (*Coriandrum sativum* L.). *International Journal of Biological Macromolecules* **118**: 844–856.
- Taparia, T., Krijger, M., Haynes, E., Elphinstone, J.G., Noble, R., and van der Wolf, J. (2020) Molecular characterization of *Pseudomonas* from *Agaricus bisporus* caps reveal novel blotch pathogens in Western Europe. *BMC Genomics* **21**: 505.
- Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F.H., Fahad, S., and Yang, X. (2015) Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany* **117**: 28–40.
- 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.
- Wang, W., Shao, Z., Liu, Y., and Wang, G. (2009) Removal of multi-heavy metals using biogenic manganese oxides generated by a deep-sea sedimentary bacterium - *Brachybacterium* sp. strain Mn32. *Microbiology* **155**: 1989–1996.
- Zapata-Carbonell, J., Bégeot, C., Carry, N., Choulet, F., Delhaultal, P., Gillet, F., et al. (2019) Spontaneous ecological recovery of vegetation in a red gypsum landfill: *Betula pendula* dominates after 10 years of inactivity. *Ecological Engineering* **132**: 31–40.
- Zappellini, C., Alvarez-Lopez, V., Capelli, N., Guyeux, C., and Chalot, M. (2018) *Streptomyces* Dominate the Soil Under *Betula* Trees That Have Naturally Colonized a Red Gypsum Landfill. *Frontiers in Microbiology* **9**.

Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., and Bai, Z. (2007) New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* **33**: 406–413.

Discussion, conclusions et perspectives

5 Discussion, conclusions et perspectives

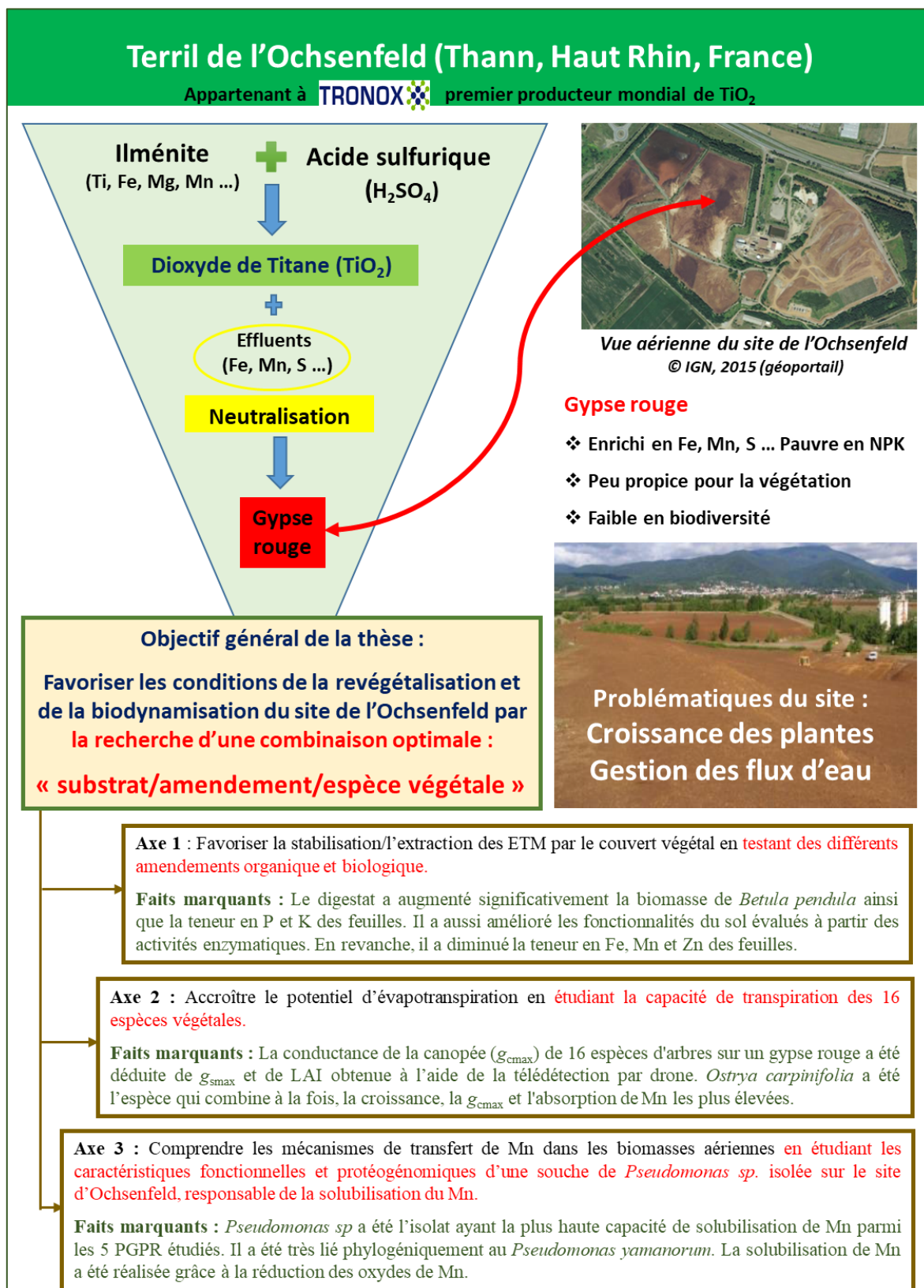


Figure 39 : Schéma explicatif du contexte et objectifs de la thèse, du site d'études et ses problématiques et enjeux, et des faits marquants de l'ensemble de ces travaux.

L'objectif principal de ma thèse était la recherche d'une combinaison optimale « substrat / amendement / espèce végétale » pour favoriser les conditions d'une meilleure revégétalisation et biodynamisation de terril de sous-produits industriels. Le terril d'Ochsenfeld situé en Alsace, dédié au stockage des gypses rouges issues de la production de dioxyde de titane, a servi de site expérimental pour des essais *in-situ*. Le gypse rouge est enrichi en ETM mais très pauvre en nutriment et en microorganismes. Ces conditions agronomique et microbiologique du gypse rouge rendent la croissance des plantes très difficile. La mise en place de stratégie de phytomanagement aidé est donc nécessaire pour apporter des connaissances fondamentales ainsi que des solutions pragmatiques pour la gestion des sites et sols pollués par des ETM. Trois questions scientifiques ont structuré cette thèse :

– Quels amendements organique (digestat) ou biologique (inoculum bactérien) donneraient une combinaison optimale « substrat/amendement » ? Une combinaison qui pourrait biodynamiser le gypse rouge, améliorer la production végétale et augmenter ainsi la capacité de stabilisation ou d'extraction des ETM, ce qui réduira à terme les impacts environnementaux des ETM en limitant la dispersion des contaminants.

– Est-ce que la sélection des espèces d'arbres pour leurs teneurs foliaires en Mn (et / ou d'autres ETM) serait-elle antagoniste avec la sélection des espèces ayant un taux de transpiration élevé ? L'espèce optimale serait celle qui a la plus grande croissance, et une forte capacité de transpiration et d'accumulation des ETM notamment le Mn.

– Quelles sont les caractéristiques fonctionnelles et génomiques d'une souche bactérienne capable de solubiliser le Mn isolée du site ? Cette solubilisation permettrait de rendre les oxydes de Mn disponibles pour les plantes.

Chaque questionnement a fait l'objet d'un chapitre de ce mémoire de thèse. Ainsi, chaque chapitre permettait de répondre à un objectif spécifique.

⇒ **Le premier objectif spécifique de ma thèse était de tester l'effet des amendements organique et biologique sur la productivité du bouleau sur gypse rouge.** Pour répondre à cet objectif, le digestat et l'inoculum bactérien ont été les deux amendements étudiés. En effet, une première étape vers un phytomanagement réussi serait de sélectionner des amendements pertinents capables de favoriser la croissance des plantes, limiter le transfert des contaminants et restaurer un microbiome efficient dans sa capacité à promouvoir la croissance des plantes. Les expériences ont été menées sur la plante modèle *Betula pendula* à court terme (6 mois) en condition contrôlée en mésocosme et à moyen terme (16 mois) *in-situ*. *B. pendula* a été sélectionnée, étant l'espèce ligneuse qui domine le mieux et colonise spontanément le site après 12 ans d'inactivité (Zapata-Carbonell et al., 2019). Elle est connue pour ses capacités d'adaptation aux différentes conditions de sol grâce à sa grande variabilité génétique (Dubois et al., 2020).

(i) Dans notre étude, l'apport de digestat au gypse rouge a permis d'augmenter la croissance et la production de biomasse de *Betula pendula*, ainsi que la teneur en P et K des feuilles, tout en diminuant la teneur en Fe, Mn et Zn des feuilles. La simple présence de nutriments essentiels sous leur forme disponible dans le digestat pourrait expliquer l'augmentation de la biomasse des bouleaux car l'amendement organique améliore la fertilité et la productivité du sol et en conséquence améliore le statut nutritif des plantes pour les nutriments potentiellement limitants tels que les N, P et K (Liu et al., 2009). La diminution des ETM pourrait s'expliquer d'une part par l'effet antagoniste dans l'absorption entre les éléments, comme relatée dans plusieurs autres études, par exemple entre P et Mn (Pedas et al., 2011), P et Ca (Jakobsen, 1993), P et Zn (Sacristán et al., 2019). D'autre part, l'augmentation de la production de biomasse sans que l'absorption des ETM ne soit modifiée (notamment Fe, Mn et Zn), entraîne forcément une diminution de ces derniers par un effet de dilution. Le digestat a permis également d'améliorer les activités microbiennes du sol en augmentant des activités enzymatiques importantes impliquées dans le fonctionnement du sol à partir du métabolisme du C, N, P et S, ce qui démontre que l'apport de digestat participe à l'amélioration du métabolisme microbien et plus globalement de l'état de santé du sol. Nos résultats sur le métabolisme microbien ont été soutenus par plusieurs études antérieures (Insam et al., 2015; Odlare et al., 2008). L'apport de digestat a donc un effet positif sur l'écosystème considéré. Ainsi, ce type d'amendement est une option crédible qui pourrait être envisagé dans la gestion des sites et sols contaminés par la phytostabilisation, ce qui permettra un développement et des débouchés pour la filière de traitement de biométhanisation des déchets. En revanche, pour

enrichir la biomasse en Mn et obtenir une phytoextraction réussie, l'utilisation d'autres amendements permettant d'améliorer la disponibilité de Mn est nécessaire. Les amendements qui par exemple diminuent le pH du sol tels que l'écorce de pin, la tourbe blonde, le compost éricacé ou le paillis de miscanthus (Zapata-Carbonell et al., 2020), pourraient être envisagés en complément au traitement digestat. Ces quatre amendements acides avaient tous permis de baisser le pH du gypse rouge de façon notable et donc favoriser l'augmentation de la fraction extractible de Mn. Mais vu la croissance des bouleaux, seul l'apport du compost éricacé a eu finalement un effet positif sur l'accumulation du Mn par les plantes. La meilleure stratégie pour une phytoextraction serait donc de combiner le digestat qui boosterait la croissance des plantes, avec l'un des amendements acides qui augmenterait la teneur de Mn dans les feuilles.

(ii) L'inoculation d'un consortium bactérien lors d'une expérience de terrain pendant 16 mois a induit un effet légèrement positif sur la croissance du bouleau, comparé à l'inoculum d'une seule souche sur une période de 6 mois qui n'a pas eu des effets visibles. L'inoculation par un consortium bactérien pourrait être donc utilisé comme stratégie de biofertilisation à moyen terme. Il est important de noter que les 5 bactéries testées dans notre étude étaient capables *in-vitro* de solubiliser le phosphate, de produire des sidérophores, de l'auxine et des acides organiques, des traits fonctionnels qui pourraient améliorer la croissance des plantes. Il a été rapporté que l'utilisation d'un consortium des bactéries sur le terrain pourrait être une stratégie pertinente d'amélioration de la croissance des plantes, de la productivité et de la fertilité des sols (Raklami et al., 2019). De plus, les métabolites bactériens produits dans la rhizosphère *in-situ* sont biodégradables et donc moins toxiques comparés aux effets des amendements chimiques (Rajkumar et al., 2012). En plus d'améliorer les conditions du sol et de favoriser la croissance des plantes, les bactéries peuvent influencer la mobilité des éléments et leur disponibilité pour les plantes par la libération de substances chélatrices, l'acidification du microenvironnement, la solubilisation du P ou les changements du potentiel redox (Jing et al., 2007). Dans notre expérience de terrain, le consortium bactérien a permis d'acidifier le sol et augmenter la fraction extractible, ce qui pourrait faciliter la mobilité des ETM et permettre leur phytoextraction. Cependant, pour une phytostabilisation réussie, les bactéries réduisant la biodisponibilité des ETM sont à privilégier. Finalement, le choix des isolats bactériens dépend de la technique de phytomanagement qui va être adoptée. Nos 5 isolats sont à même de répondre à l'augmentation de la fraction extractible et donc à améliorer la phytoextraction à moyen et à long terme.

Le digestat ainsi que les PGPR utilisés comme amendements sont des options considérées comme une solution durable pour stimuler la croissance des plantes et *in-fine* permettre la revégétalisation et la biodynamisation des terrils de gypse rouge. En outre, ils ont un fort impact environnemental positif sur la qualité du sol. Il serait donc nécessaire de suivre des différents paramètres physico-chimiques (pH, Eh, MO, N, P, K et autres ETM), et biologique (biomasse bactérienne) du substrat avant et après chaque expérience. Entre autres il s'agirait de :

- Réaliser des études à plus long terme (4 à 5 ans) sur ces différents paramètres suivis pour confirmer ou infirmer l'innocuité de ces types d'amendements dans le temps.

- Mener une expérience en pot en condition contrôlée avec un substrat autoclavé et s'assurer que l'inoculum bactérien s'est bien intégré à la rhizosphère.

*- Exploiter entre-autre le génome de bouleau pour identifier des marqueurs moléculaires de résistance et d'accumulation du Mn, pour comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu permettant au *B. pendula* de tolérer la teneur en Mn du substrat, ainsi que sa réponse écophysiological face à la biodynamisation. Cela permettrait par ailleurs de concevoir un outil de sélection d'espèces de bouleaux avec des capacités d'accumulation encore supérieures.*

⇒ **Le second objectif de ce travail de thèse était d'étudier la relation entre la transpiration et la translocation des ETM**, afin de sélectionner les espèces ligneuses qui ont une forte capacité de transpiration pour accroître le potentiel d'évapotranspiration de la lagune et limiter ainsi les quantités d'eau à traiter en sortie de lagune et les coûts de traitements avant rejet dans l'environnement. Pour y répondre, nous avons choisi d'étudier *in-situ* 16 espèces ligneuses sur un dispositif de phytomanagement installé en 2014 dans le cadre du projet PROLIPHYT. Peu d'espèces végétales se sont avérées capables de survivre dans des sous-produits résiduels, et la transplantation ou l'ensemencement direct a rarement été rapporté comme un succès (Huang et al., 2012; Verdugo et al., 2011). C'est pourquoi, avant la plantation, il a été ajouté au terril une couche de 30 cm de terre saine obtenue d'une source locale (Ciadamidaro et al., 2019). Au travers de cet objectif, nous avons pu mettre en évidence que :

- La télédétection, ensemble des techniques qui exploitent le rayonnement électromagnétique pour mesurer les propriétés d'un objet à distance, a permis de calculer des indices de végétation (LAI et NDVI) afin de cartographier la biomasse végétale de notre parcelle d'étude. Une approche basée sur le drone a été utilisée pour acquérir des images à très basse altitude permettant d'obtenir de résolutions quasi-indépendantes des effets de l'atmosphère en volant en-dessous de la couverture nuageuse. La télédétection basée sur les drones utilise les propriétés optiques de la végétation qui sont étroitement liées à ses paramètres biophysiques et biochimiques. L'impact des contaminants sur ces derniers se traduit par des modifications de réflectance des feuilles et des couverts végétaux, plus ou moins marquées selon l'espèce et le temps d'exposition. Les valeurs de LAI et de NDVI varient donc beaucoup au cours de la saison. Cette variation de LAI a été démontrée pour des espèces appartenant au genre *Salix* et *Populus* (Rüth et al., 2007). Le LAI combiné à la g_{smax} a permis d'estimer la conductance à l'échelle de la canopée (g_{cmax}). Cette approche simple ignore les différences de la densité de canopée d'une espèce à une autre (De Kauwe et al., 2013). Etant donné que certaines espèces se développent plus densément que d'autres, il est raisonnable de supposer que certains g_{cmax} soient sous-estimées. Cependant, l'expérience réalisée en mésocosme au laboratoire où la transpiration des arbres a été mesurée par la méthode de pesée, a permis de confirmer les résultats de terrain. Ce biais induit donc par l'effet de la densité n'a finalement pas d'impact sur l'estimation de la g_{cmax} . Ce proxy g_{cmax} s'avère donc être un outil pertinent pour évaluer la performance des arbres particulièrement leurs capacités à gérer les flux d'eau, par rapport aux proxys traditionnels, tels que NDVI, LAI ou g_{smax} lorsqu'ils sont considérés séparément.

- Sur la base de cette étude, *Ostrya carpinifolia* a combiné la croissance, la conductance de la canopée et l'absorption de Mn les plus élevées comparé aux autres espèces. La hauteur des *O. carpinifolia* sur notre site d'études ainsi que sur deux autres sites de phytomanagement situés à Carrières-sous-Poissy et Leforest, a été identique à celle obtenue avec des standards de pépinière (Ciadamidaro et al., 2019). *O. carpinifolia* est une espèce qui a besoin d'une faible quantité de ressources pour sa croissance et joue une fonction importante dans la végétation forestière (Tardella et al., 2019). Elle est capable de pousser sur des sols peu profonds et peu développés, principalement sur le calcaire et le gypse (Pasta et al., 2016). Avec des valeurs de croissance et de g_{cmax} plus élevées comparées aux autres espèces ligneuses plantées, *O. carpinifolia* aurait donc le plus grand potentiel pour maximiser les flux de transpiration. Les feuilles d'*O. carpinifolia* sont enrichies en Mn, comme celles de *B. pendula*, une autre espèce

appartenant à la famille des *Betulaceae*. Cela ouvre de nouvelles perspectives dans les domaines de recherche en phytomining.

- Nous avons aussi démontré que la teneur en Mn foliaire est liée à la capacité de transpiration d'arbres étudiés, contrairement à la teneur en Zn qui n'est pas du tout corrélée aux flux de l'eau dans l'arbre. Il est connu que chez les plantes vasculaires, la translocation de certains ETM s'effectue par vascularisation composée de xylème et phloème (Page and Feller, 2005). La translocation des ETM peut donc être associée à la circulation de l'eau des racines vers les feuilles. L'eau, qui s'évapore des feuilles, sert de pompe pour absorber les nutriments et autres substances du sol pour les végétaux. Ce flux de transpiration via le xylème ainsi que le transport de la sève élaborée dans le phloème sont des processus importants pour la redistribution des ETM dans la plante (Marschner, 2011). Le Mn et le Zn sont facilement transportés par le xylème vers la partie aérienne. Ensuite, le Mn reste essentiellement immobile dans le phloème, tandis que le Zn est redistribué vers les parties les plus jeunes de la plante via le phloème (Page and Feller, 2015). (Xu et al., 2006) ont rapporté que la teneur en Mn d'une feuille diminuait d'environ 90 % lorsqu'elle est enveloppée dans un sac plastique transparent pour supprimer le taux de transpiration. En revanche, la teneur en d'autres éléments n'était pas significativement liée à la transpiration, par exemple, l'absorption de Zn n'était pas affectée par la capacité de transpiration de l'espèce d'arbre. La gestion simultanée de l'absorption des ETM et du flux d'eau dans les terrils dépend donc fortement des ETM concernés. Pour le Mn sur le site de l'Ochsenfeld par exemple, son accumulation étant corrélée positivement à la transpiration, il est possible d'utiliser des espèces ligneuses pour obtenir une biomasse enrichie, et accroître le potentiel d'évapotranspiration du site.

- La revégétalisation du terri de gypse rouge avec des espèces d'arbres adéquates est essentielle pour stabiliser le sol, limiter l'envol de poussières chargées en contaminants et maximiser les flux de transpiration. Historiquement la revégétalisation des sols contaminés reposait essentiellement sur quelques genres et cultivars ligneux à croissance rapide tels que les peupliers et les saules (Ciadamidaro et al., 2019). Il est aussi possible d'amender le site avec le digestat et un consortium de PGPB tout en privilégiant une espèce indigène, *B. pendula*, qui colonise de façon spontanée le site d'Ochsenfeld (Zapata-Carbonell et al., 2019). Cette végétation spontanée ayant des caractéristiques physiologiques et des capacités de tolérance intrinsèques à plusieurs facteurs de stress, offre plus de garanties, en permettant le développement d'une flore locale et en limitant l'apparition des plantes exogènes. Cependant grâce à notre

étude, il apparaît que d'autres espèces, notamment *O. carpinifolia*, peuvent être privilégiées pour la phytostabilisation. *O. carpinifolia*, sans être une espèce locale, peut aussi apporter une réponse à la problématique du changement climatique. Il est présent au sud de l'Europe, depuis les bords de la Méditerranée orientale jusqu'au sud de la Suisse, de l'Autriche et, à l'est, jusqu'en Bulgarie. Sa tolérance relative à la sécheresse explique sa présence dans une grande partie du bassin méditerranéen (du sud-est de la France au Liban).

La sélection des espèces végétales est une étape importante pour la mise en place des opérations de phytomanagement. Avant de proposer un projet de revégétalisation des zones nues et de démontrer que les terrils de stockage de sous-produits industriels peuvent être revitalisés tout en produisant une biomasse valorisable, il est recommandé de :

- Suivre les conditions météorologiques et la teneur en eau du sol dans des secteurs avec et sans végétation.

- Réaliser un bilan hydrique complet et précis grâce aux lysimètres en évaluant les eaux des lagunes (flux entrants = eau contaminée en provenance de l'exhaure minier + précipitations ; flux sortants = eau sortie de lagune + évapotranspiration + interception foliaire).

- Etudier l'impact de la revégétalisation sur le statut hydrique et la spéciation des ETM en profondeur afin de comprendre l'influence du sol végétalisé néoformé et les mécanismes physiologiques racinaires sur les modifications possibles dans la mobilité des ETM.

- Etudier au niveau moléculaire à l'aide des analyses transcriptomiques les mécanismes d'accumulation des ETM notamment le Mn dans les plantes, pour une meilleure acquisition de la connaissance fondamentale sur la capacité de tolérance des plantes.

- Démocratiser les approches de télédétection par drone, alternative aux méthodes longues et fastidieuses de mesures dendrométriques et écophysiologicals. Comme perspective, il serait possible de combiner l'imagerie passive avec des technologies de télédétection active comme le RADAR ou le LIDAR, et exploiter des différentes plateformes de capteurs (satellite et drone) avec une grande diversité spectrale, pour suivre la croissance des plantes à l'aide d'autres indices de végétation, évaluer les concentrations en ETM des plantes et du sol, et permettre un monitoring permanent de la contamination via l'étude des traits physiologiques de la plante.

⇒ **Le troisième et dernier objectif de la thèse était d'étudier les caractéristiques fonctionnelles d'un isolat de *Pseudomonas sp* à haute capacité de solubilisation de Mn, provenant d'un terril de gypse rouge**, ceci dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires bactériens impliqués dans la solubilisation de Mn dans le sol et son transfert dans le continuum sol-plante. Le Mn a été étudié en particulier car c'est l'un des principaux contaminants du site d'études. Nous avons pu mettre en évidence que l'isolat S3 *Pseudomonas sp* est celui qui a la plus haute capacité de solubilisation de Mn parmi les 5 PGPR étudiées. Cet isolat réduit les oxydes de Mn en les utilisant comme accepteur final d'électrons. Il a été démontré par exemple que la souche *Shewanella putrefaciens* réduisant le Fe(III) et le Mn(IV) respire sur un nombre remarquable d'accepteurs terminaux d'électrons, notamment : O, NO₃⁻, NO₂⁻, U(VI), Fe(III), Mn(IV) (DiChristina et al., 2002).

L'isolat S3 (*Pseudomonas sp*) est très lié phylogéniquement à *Pseudomonas yamanorum*, qui est une souche qu'on peut qualifier d'extrémophile, car elle peut prospérer dans des conditions environnementales hostiles. Elle a été isolée par exemple d'un environnement subantarctique à Ushuaia, en Argentine (Arnau et al., 2015) et d'un échantillon de sol laissé sous la neige pendant une période d'environ 6 mois à Erzurum, en Turquie (Komesli et al., 2020). Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont dotées d'une chaîne respiratoire très ramifiée qui utilise l'oxygène ou les oxydes de N, de Mn ou de Fe comme accepteurs finaux d'électrons. Elles possèdent donc un large répertoire de mécanismes moléculaires qui permettent leur adaptation à l'environnement, notamment un métabolisme flexible qui joue un rôle essentiel dans leur capacité à coloniser diverses niches (Liang et al., 2020). Dans le génome de notre isolat à haute capacité de solubilisation de Mn *Pseudomonas sp*, nous n'avons pas pu identifier les gènes connus jouant un rôle dans la réduction des oxydes de Mn. Les perspectives sont la recherche des gènes impliqués dans l'acidification, paramètre qui favorise indirectement la solubilisation des ETM.

L'efficacité de la phytoremédiation peut être améliorée à l'aide de PGPR, qui peuvent transformer des ETM en formes biodisponibles et solubles. Parmi les 5 PGPR, l'isolat S3 *Pseudomonas sp* a été le plus efficace. ***Il serait donc nécessaire de poursuivre la caractérisation de cet isolat en étudiant son métabolisme biochimique, son impact sur les exsudats racinaires de la plante hôte, et la capacité de solubilisation de Mn des mutants.***

Dans un contexte général de dégradation des sols par des activités industrielles, la gestion des sites et sols pollués est de nos jours un enjeu environnemental et sanitaire majeur. Le Grenelle de l'Environnement en France compte les sites et sols pollués parmi ses champs d'action prioritaires. *L'article 43 de la loi n° 2009-967 du 3 août 2009 de programmation relative à la mise en œuvre du Grenelle de l'environnement* précise que « les techniques de dépollution par les plantes seront de préférence utilisées » pour la réhabilitation des sites pollués. C'est le phytomanagement, une approche innovante utilisant des plantes pour immobiliser, extraire et/ou dégrader des polluants. S'appliquant *in situ* en milieu rural et urbain, le phytomanagement constitue une alternative ou un complément aux techniques classiques. En effet, compte tenu des volumes importants de terres à traiter et des coûts élevés, le phytomanagement offre pour des terrains, un mode de gestion économiquement acceptable. En plus, il faut souligner la valorisation possible de la biomasse produite. D'un point de vue écologique, le phytomanagement permet la végétalisation des sites contaminés par des ETM. La mise en place de cette couverture végétale est essentielle pour limiter l'érosion du sol, limiter l'envol de poussières, limiter le lessivage des éléments toxiques et leur transfert vers la nappe phréatique, et enfin maintenir ou restaurer une microflore et une microfaune adaptée, garants de la fonctionnalité des sols. Il est donc en parfaite adéquation avec les principes du développement durable (faible perturbation du site, bonne intégration paysagère, utilisation à bon escient des ressources de la nature). De ce fait, le phytomanagement permet la transition d'un passé industriel à un futur durable. L'installation durable d'espèces végétales qui tolèrent des teneurs élevées en ETM, permettrait ainsi de restaurer les fonctions de support et de production des sols fortement anthropisés, tout en réduisant les impacts environnementaux des espaces dégradés. Ce projet de phytomanagement correspond donc pleinement aux priorités économiques et environnementales actuelles d'ingénierie et d'innovation écologique, de recyclage des déchets selon une logique d'économie circulaire, de valorisation de la biomasse et de transition des ressources fossiles vers le renouvelable.

En conclusion, tous les résultats de cette thèse pris dans leur ensemble montrent que :

- i. Le digestat pouvait améliorer la croissance des plantes ainsi que la teneur des nutriments P et K dans les feuilles tout en diminuant la teneur des ETM notamment le Mn et le Zn.
- ii. En revanche, l'isolat *Pseudomonas sp* avec sa plus grande capacité de solubilisation de Mn, avait un effet légèrement positif sur la croissance des plantes et sur l'absorption des ETM que lorsqu'il était combiné à d'autres PGPR sur un moyen terme.
- iii. La combinaison entre le digestat et l'inoculum formé d'un consortium bactérien serait donc l'amendement optimal pour biodynamiser le gypse rouge, et favoriser la croissance des plantes évaluée à partir de l'indice de surface foliaire (LAI).
- iv. La conductance maximale de la canopée pouvait être dérivée de la conductance stomatique et de LAI obtenue par la méthode d'imagerie 3D à l'aide de la télédétection par drone.
- v. Les espèces *Ostrya carpinifolia* et *Betula pendula* combinaient à la fois une forte conductance stomatique et une teneur en Mn relativement élevée, comparées aux 14 autres espèces étudiées.
- vi. Enfin, *Ostrya carpinifolia* avec sa très forte croissance, avait le plus grand potentiel pour revégétaliser le terroir et maximiser les flux de transpiration dans ces conditions agronomiques et environnementales difficiles.

Annexes

Annexes

Composition du milieu de culture 284 (Schlegel et al., 1961)

Milieu 284	
Composant	Quantité pour 1 L
Tris-HCl	6,06 g
NaCl	4,68 g
KCl	1,49 g
NH ₄ Cl	1,07 g
Na ₂ SO ₄	0,43 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,04 g
Fe(III)NH ₄ citrate	0,048 g
Glucose	0,52 g
Fructose	0,54 g
Lactate	0,35 g
Gluconate	0,66 g
Succinate	0,81 g
Solution de microéléments*	1 ml
Agar pour M284 solide	15 g

* La solution de microéléments est composée de :

Solution de microéléments	
Composant	Quantité pour 1 L
HCl 25%	1,3 ml
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,017 g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,036 g
H ₃ BO ₃	0,062 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,19 g
Ajuster le pH à 7	

Composition du milieu de culture Pikovskaya (Nautiyal, 1999)

Milieu PVK	
Composant	Quantité pour 1 L
Glucose	10 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
NaCl	0.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
KCl	0.2 g
Extrait de levure	0.5 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.002 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002 g
Agar	15 g

Composition du bouillon cœur-cervele

Composant	Quantité pour 1 L
Extrait de cœur	10 g
Extrait de cervelle	7,5 g
Peptone	10 g
Glucose	2 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Ajuster le pH à 7,4 ± 0,2	

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abubakari, F., Nkrumah, P.N., Fernando, D.R., Erskine, P.D., Echevarria, G., van der Ent, A., 2022. Manganese Accumulation and Tissue-level Distribution in the Australian Hyperaccumulator *Gossia Bidwillii* (Myrtaceae). *Trop. Plant Biol.* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12042-021-09307-1>
- Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B., Munjal, A., Baunthiyal, M., Sharma, V., 2011. Metal Toxicity and Photosynthesis, in: *Photosynthesis: Overviews on Recent Progress and Future Perspectives*. p. 16: 229-236.
- Akinrinlola, R.J., Yuen, G.Y., Drijber, R.A., Adesemoye, A.O., 2018. Evaluation of *Bacillus* Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits. *Int. J. Microbiol.* 2018, 5686874. <https://doi.org/10.1155/2018/5686874>
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Alloway, B.J. (Ed.), 2013. *Heavy Metals in Soils, Environmental Pollution*. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7>
- Álvarez-Fernández, A., Díaz-Benito, P., Abadía, A., Lopez-Millan, A.-F., Abadía, J., 2014. Metal species involved in long distance metal transport in plants. *Front. Plant Sci.* 5.
- Anderson, I.C., Cairney, J.W.G., 2007. Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 388–406. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00073.x>
- Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S.M., Ok, Y.S., Sebastian, A., Baum, C., Prasad, M.N.V., Wenzel, W.W., Rinklebe, J., 2017. Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Sci. Rev.* 171, 621–645. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.06.005>
- Arnau, V.G., Sánchez, L.A., Delgado, O.D. 2015, 2015. *Pseudomonas yamanorum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a subantarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 424–431. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065201-0>
- Arthurson, V., 2009. Closing the Global Energy and Nutrient Cycles through Application of Biogas Residue to Agricultural Land – Potential Benefits and Drawback. *Energies* 2, 226–242. <https://doi.org/10.3390/en20200226>
- Arwidsson, Z., Johansson, E., von Kronhelm, T., Allard, B., van Hees, P., 2009. Remediation of Metal Contaminated Soil by Organic Metabolites from Fungi I—Production of Organic Acids. *Water. Air. Soil Pollut.* 205, 215. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0067-z>
- Assad, M., Tatin-Froux, F., Blaudez, D., Chalot, M., Parelle, J., 2017. Accumulation of trace elements in edible crops and poplar grown on a titanium ore landfill. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 5019–5031. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8242-4>
- ATSDR, 2020. Substance Priority List | ATSDR [WWW Document]. URL <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html> (accessed 4.1.22).
- Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D.L., 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of

- Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9.
- Bacour, C., Bréon, F.-M., Maignan, F., 2006. Normalization of the directional effects in NOAA–AVHRR reflectance measurements for an improved monitoring of vegetation cycles. *Remote Sens. Environ.* 102, 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2006.03.006>
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., Piché, Y., 1998. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139, 375–388. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00199.x>
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France) - Références et stratégies d'interprétation. Programme ASPITET - (EAN13 : 9782759215508) |, Librairie Quae : des livres au coeur des sciences. ed.
- Ballesteros, R., Ortega, J.F., Hernández, D., Moreno, M.A., 2014. Applications of georeferenced high-resolution images obtained with unmanned aerial vehicles. Part I: Description of image acquisition and processing. *Precis. Agric.* 15, 579–592. <https://doi.org/10.1007/s11119-014-9355-8>
- Bandara, P.C., Peña-Bahamonde, J., Rodrigues, D.F., 2020. Redox mechanisms of conversion of Cr(VI) to Cr(III) by graphene oxide-polymer composite. *Sci. Rep.* 10, 9237. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65534-8>
- Baret, F., Guyot, G., Major, D.J., 1989. TSAVI: A Vegetation Index Which Minimizes Soil Brightness Effects On LAI And APAR Estimation, in: 12th Canadian Symposium on Remote Sensing Geoscience and Remote Sensing Symposium,. Presented at the 12th Canadian Symposium on Remote Sensing Geoscience and Remote Sensing Symposium, pp. 1355–1358. <https://doi.org/10.1109/IGARSS.1989.576128>
- Basol, 2020. Sites pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif. Ministère Transit. Écologique Fr. <http://basol.developpement-durable.gouv.fr>
- Berthelot, C., Leyval, C., Foulon, J., Chalot, M., Blaudez, D., 2016. Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw144. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw144>
- Bhaduri, A.M., Fulekar, M.H., 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 11, 55–69. <https://doi.org/10.1007/s11157-011-9251-x>
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K., Tuteja, N., 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb. Cell Factories* 13, 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Blackburn, G.A., 2007. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *J. Exp. Bot.* 58, 855–867. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl123>
- Blagodatsky, S.A., Richter, O., 1998. Microbial growth in soil and nitrogen turnover: a theoretical model considering the activity state of microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1743–1755. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00028-5)
- Bolan, N.S., Choppala, G., Kunhikrishnan, A., Park, J., Naidu, R., 2013. Microbial Transformation of Trace Elements in Soils in Relation to Bioavailability and Remediation, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, pp. 1–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6470-9_1

- Bolan, N.S., Park, J.H., Robinson, B., Naidu, R., Huh, K.Y., 2011. Chapter four - Phytostabilization: A Green Approach to Contaminant Containment, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 145–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385538-1.00004-4>
- Bonnet, S., Toromanoff, F., Fourneau, F., Lejeune, P., 2011. Principes de base de la télédétection et ses potentialités comme outil de caractérisation de la ressource forestière. i. images aériennes et satellitaires. *Forêt Wallonne* 114, 12.
- Bourrelier, P., Berthelin, J., Pedro, G., SCIENCES ACADEMIES, 1998. Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. EDITIONS TEC ET DOC - LAVOISIER. PARIS.
- Braun, J.H., Baidins, A., Marganski, R.E., 1992. TiO₂ pigment technology: a review. *Prog. Org. Coat.* 20, 105–138. [https://doi.org/10.1016/0033-0655\(92\)80001-D](https://doi.org/10.1016/0033-0655(92)80001-D)
- Breitkreuz, C., Buscot, F., Tarkka, M., Reitz, T., 2020. Shifts Between and Among Populations of Wheat Rhizosphere *Pseudomonas*, *Streptomyces* and *Phyllobacterium* Suggest Consistent Phosphate Mobilization at Different Wheat Growth Stages Under Abiotic Stress. *Front. Microbiol.* 10.
- Bresson, J., Varoquaux, F., Bontpart, T., Touraine, B., Vile, D., 2013. The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 200, 558–569. <https://doi.org/10.1111/nph.12383>
- Cabral, L., Soares, C.R.F.S., Giachini, A.J., Siqueira, J.O., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1655–1664. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1918-y>
- Caldwell, B.A., Jumpponen, A., Trappe, J.M., 2000. Utilization of Major Detrital Substrates by Dark-Septate, Root Endophytes. *Mycologia* 92, 230–232. <https://doi.org/10.2307/3761555>
- Chandel, N.S., Rajwade, Y.A., Golhani, K., Tiwari, P.S., Dubey, K., Jat, D., 2021. Canopy spectral reflectance for crop water stress assessment in wheat (*Triticum aestivum*, L.)*. *Irrig. Drain.* 70, 321–331. <https://doi.org/10.1002/ird.2546>
- Chandra, R., Kang, H., 2016. Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. *For. Sci. Technol.* 12, 55–61. <https://doi.org/10.1080/21580103.2015.1044024>
- Chandran, H., Meena, M., Sharma, K., 2020. Microbial Biodiversity and Bioremediation Assessment Through Omics Approaches. *Front. Environ. Chem.* 1.
- Chen, L., Dodd, I.C., Theobald, J.C., Belimov, A.A., Davies, W.J., 2013. The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. *J. Exp. Bot.* 64, 1565–1573. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert031>
- Chen, W., Li, X., He, H., Wang, L., 2018. A Review of Fine-Scale Land Use and Land Cover Classification in Open-Pit Mining Areas by Remote Sensing Techniques. *Remote Sens.* 10, 15. <https://doi.org/10.3390/rs10010015>
- Ciadamidaro, L., Girardclos, O., Bert, V., Zappelini, C., Yung, L., Foulon, J., Papin, A., Roy, S., Blaudez, D., Chalot, M., 2017. Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. *Environ. Exp. Bot.* 139, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.04.004>

- Ciadamidaro, L., Parelle, J., Tatin-Froux, F., Moyen, C., Durand, A., Zappelini, C., Morin-Crini, N., Soupe, D., Blaudez, D., Chalot, M., 2019. Early screening of new accumulating versus non-accumulating tree species for the phytomanagement of marginal lands. *Ecol. Eng.* 130, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.02.010>
- Citeau, L., Bispo, B., King, 2008. *Gestion durable des sols - - (EAN13 : 9782759209729)* |, Librairie Quae : des livres au coeur des sciences.
- Claisse, P., Ganjian, E., Tyrer, M., 2008. The Use of Secondary Gypsum to Make a Controlled Low Strength Material. *Open Constr. Build. Technol. J.* 2. <https://doi.org/10.2174/1874836800802010294>
- Colomina, I., Molina, P., 2014. Unmanned aerial systems for photogrammetry and remote sensing: A review. *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens.* 92, 79–97. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2014.02.013>
- Courtney, R., Feeney, E., O’Grady, A., 2014. An ecological assessment of rehabilitated bauxite residue. *Ecol. Eng.* 73, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.064>
- Courtney, R., Harrington, T., Byrne, K.A., 2013. Indicators of soil formation in restored bauxite residues. *Ecol. Eng.* 58, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.06.022>
- Courtney, R., Mullen, G., Harrington, T., 2009. An Evaluation of Revegetation Success on Bauxite Residue. *Restor. Ecol.* 17, 350–358. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2008.00375.x>
- Cramer, M., Hawkins, H.-J., Verboom, G., 2009. The importance of nutritional regulation of plant water flux. *Oecologia* 161, 15–24. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1364-3>
- Cristina, G., Camelin, E., Tommasi, T., Fino, D., Pugliese, M., 2020. Anaerobic digestates from sewage sludge used as fertilizer on a poor alkaline sandy soil and on a peat substrate: Effects on tomato plants growth and on soil properties. *J. Environ. Manage.* 269, 110767. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110767>
- Croft, H., Chen, J.M., Luo, X., Bartlett, P., Chen, B., Staebler, R.M., 2017. Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Glob. Change Biol.* 23, 3513–3524. <https://doi.org/10.1111/gcb.13599>
- Cundy, A., Bardos, P., Puschenreiter, M., Witters, N., Mench, M., Bert, V., Friesl-Hanl, W., Müller, I., Weyens, N., Vangronsveld, J., 2015. Developing Effective Decision Support for the Application of “Gentle” Remediation Options: The GREENLAND Project. *Remediat. J.* 25, 101–114. <https://doi.org/10.1002/rem.21435>
- Dalal, N., Jalandra, R., Sharma, M., Prakash, H., Makharia, G.K., Solanki, P.R., Singh, R., Kumar, A., 2020. Omics technologies for improved diagnosis and treatment of colorectal cancer: Technical advancement and major perspectives. *Biomed. Pharmacother.* 131, 110648. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110648>
- DalCorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G., Furini, A., 2019. Heavy Metal Pollutions: State of the Art and Innovation in Phytoremediation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3412. <https://doi.org/10.3390/ijms20143412>
- Dalvi, A.A., Bhalerao, S.A., 2013. Response of Plants towards Heavy Metal Toxicity: An overview of Avoidance, Tolerance and Uptake Mechanism. *Ann. Plant Sci.* 7.
- Damour, G., Simonneau, T., Cochard, H., Urban, L., 2010. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant Cell Environ.* 33, 1419–1438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02181.x>

- Daughtry, C.S.T., Walthall, C.L., Kim, M.S., de Colstoun, E.B., McMurtrey, J.E., 2000. Estimating Corn Leaf Chlorophyll Concentration from Leaf and Canopy Reflectance. *Remote Sens. Environ.* 74, 229–239. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(00\)00113-9](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(00)00113-9)
- David, B.V., Chandrasehar, G., Selvam, P.N., 2018. Chapter 10 - *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops, in: Prasad, R., Gill, S.S., Tuteja, N. (Eds.), *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. Elsevier, pp. 221–243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00010-4>
- De Kauwe, M.G., Medlyn, B.E., Zaehle, S., Walker, A.P., Dietze, M.C., Hickler, T., Jain, A.K., Luo, Y., Parton, W.J., Prentice, I.C., Smith, B., Thornton, P.E., Wang, S., Wang, Y.P., Wårlind, D., Weng, E., Crous, K.Y., Ellsworth, D.S., Hanson, P.J., Seok Kim, H., Warren, J.M., Oren, R., Norby, R.J., 2013. Forest water use and water use efficiency at elevated CO₂: A model-data intercomparison at two contrasting temperate forest FACE sites. *Glob. Change Biol.* 19, 1759–1779. <https://doi.org/10.1111/gcb.12164>
- DESA PD, 2019. World Population Prospects 2019. U. N. <https://population.un.org/wpp/>
- Dessureault-Rompré, J., Luster, J., Schulin, R., Tercier-Waeber, M.-L., Nowack, B., 2010. Decrease of labile Zn and Cd in the rhizosphere of hyperaccumulating *Thlaspi caerulescens* with time. *Environ. Pollut.* 158, 1955–1962. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.032>
- Di Carlo, E., Boulemant, A., Courtney, R., 2019. A field assessment of bauxite residue rehabilitation strategies. *Sci. Total Environ.* 663, 915–926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.376>
- DiChristina, T.J., Moore, C.M., Haller, C.A., 2002. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction by *Shewanella putrefaciens* Requires *ferE*, a Homolog of the *pule* (*gspE*) Type II Protein Secretion Gene. *J. Bacteriol.* 184, 142–151. <https://doi.org/10.1128/JB.184.1.142-151.2002>
- Dickinson, N.M., Baker, A.J.M., Doronila, A., Laidlaw, S., Reeves, R.D., 2009. Phytoremediation of Inorganics: Realism and Synergies. *Int. J. Phytoremediation* 11, 97–114. <https://doi.org/10.1080/15226510802378368>
- Dickinson, N.M., Pulford, I.D., 2005. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environ. Int.* 31, 609–613. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.013>
- Dixon, H.H., Joly, J., 1895. On the Ascent of Sap. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 186, 563–576.
- Donachie, 2000. *Titanium: A Technical Guide*, 2nd Edition - ASM International.
- Drisya, J., D, S.K., Roshni, T., 2018. Chapter 27 - Spatiotemporal Variability of Soil Moisture and Drought Estimation Using a Distributed Hydrological Model, in: Samui, P., Kim, D., Ghosh, C. (Eds.), *Integrating Disaster Science and Management*. Elsevier, pp. 451–460. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812056-9.00027-0>
- Dubois, H., Verkasalo, E., Claessens, H., 2020. Potential of Birch (*Betula pendula* Roth and *B. pubescens* Ehrh.) for Forestry and Forest-Based Industry Sector within the Changing Climatic and Socio-Economic Context of Western Europe. *Forests* 11, 336. <https://doi.org/10.3390/f11030336>
- Dubovik, O., Schuster, G.L., Xu, F., Hu, Y., Bösch, H., Landgraf, J., Li, Z., 2021. Grand Challenges in Satellite Remote Sensing. *Front. Remote Sens.* 2.

- Ducic, T., Polle, A., 2005. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 103–112. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100009>
- Duyvesteyn, W.P.C., Sabacky, B.J., Verhulst, D.E.V., West-Sells, P.G., Spitler, T.M., Vince, A., Burkholder, J.R., Huls, B.J.P.M., 2002. Processing titaniferous ore to titanium dioxide pigment. US6375923B1.
- Elachi, C., Zyl, J.J. van, 2021. *Introduction to the Physics and Techniques of Remote Sensing*. John Wiley & Sons.
- Ettler, V., Mihaljevič, M., Šebek, O., Grygar, T., 2007. Assessment of single extractions for the determination of mobile forms of metals in highly polluted soils and sediments—Analytical and thermodynamic approaches. *Anal. Chim. Acta* 602, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.017>
- Evangelides, C., Nobajas, A., 2020. Red-Edge Normalised Difference Vegetation Index (NDVI705) from Sentinel-2 imagery to assess post-fire regeneration. *Remote Sens. Appl. Soc. Environ.* 17, 100283. <https://doi.org/10.1016/j.rsase.2019.100283>
- Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H., Günthardt-Goerg, M.S., Schulin, R., 2013. Metal Uptake and Allocation in Trees Grown on Contaminated Land: Implications for Biomass Production. *Int. J. Phytoremediation* 15, 77–90. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.670317>
- Evans, K., 2016. The History, Challenges, and New Developments in the Management and Use of Bauxite Residue. *J. Sustain. Metall.* 2, 316–331. <https://doi.org/10.1007/s40831-016-0060-x>
- Fall, A.F., Nakabonge, G., Ssekandi, J., Founoune-Mboup, H., Apori, S.O., Ndiaye, A., Badji, A., Ngom, K., 2022. Roles of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Soil Fertility: Contribution in the Improvement of Physical, Chemical, and Biological Properties of the Soil. *Front. Fungal Biol.* 3.
- Fasani, E., Manara, A., Martini, F., Furini, A., DalCorso, G., 2018. The potential of genetic engineering of plants for the remediation of soils contaminated with heavy metals. *Plant Cell Environ.* 41, 1201–1232. <https://doi.org/10.1111/pce.12963>
- Faure, O., Doumas, M., Conord, C., Bouchardon, J.L., Douay, F., Leprêtre, A., Scheifler, R., 2012. Efficience de la phytostabilisation sur le comportement et les transferts des éléments traces métalliques dans les écosystèmes terrestres, in: *Journée Technique “Phytotechnologies.”* ADEME Editions, Paris, France, pp. 36–44.
- Fauziah, I., Zauyah, S., Jamal, T., 1996. Characterization and land application of red gypsum: a waste product from the titanium dioxide industry. *Sci. Total Environ.* 188, 243–251. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05179-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05179-0)
- Feix, I., Tremel-Schaub, A., 2005. Contamination des sols - Transferts des sols vers les plantes - (EAN13 : 9782759802616) |. EDP Sciences.
- Fernando, D.R., Marshall, A.T., Forster, P.I., Hoebee, S.E., Siegele, R., 2013. Multiple metal accumulation within a manganese-specific genus. *Am. J. Bot.* 100, 690–700. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200545>
- Ferrarini, A., Martani, E., Fornasier, F., Amaducci, S., 2020. High C input by perennial energy crops boosts belowground functioning and increases soil organic P content. *Agric. Ecosyst. Environ.* 308, 107247. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107247>
- Finngean, G., O’Grady, A., Courtney, R., 2018. Plant assays and avoidance tests with collembola and earthworms demonstrate rehabilitation success in bauxite residue. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0632-8>

- Fonte, J., Meunier, E., Gonçalves, J.A., Dias, F., Lima, A., Gonçalves-Seco, L., Figueiredo, E., 2021. An Integrated Remote-Sensing and GIS Approach for Mapping Past Tin Mining Landscapes in Northwest Iberia. *Remote Sens.* 13, 3434. <https://doi.org/10.3390/rs13173434>
- Fujimura, K.E., Egger, K.N., Henry, G.H.R., 2008. The effect of experimental warming on the root-associated fungal community of *Salix arctica*. *ISME J.* 2, 105–114. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.89>
- Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma, Biogeochemical processes and the role of heavy metals in the soil environment* 122, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.002>
- Gajić, G., Djurdjević, L., Kostić, O., Jarić, S., Mitrović, M., Pavlović, P., 2018. Ecological Potential of Plants for Phytoremediation and Ecorestoration of Fly Ash Deposits and Mine Wastes. *Front. Environ. Sci.* 6.
- García Teijeiro, R., Belimov, A.A., Dodd, I.C., 2020. Microbial inoculum development for ameliorating crop drought stress: A case study of *Variovorax paradoxus* 5C-2. *New Biotechnol.* 56, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.12.006>
- Gates, D.M., Keegan, H.J., Schleter, J.C., Weidner, V.R., 1965. Spectral Properties of Plants. *Appl. Opt.* 4, 11–20. <https://doi.org/10.1364/AO.4.000011>
- Gázquez, M.J., Bolívar, J.P., García-Tenorio, R., Vaca, F., 2009. Physicochemical characterization of raw materials and co-products from the titanium dioxide industry. *J. Hazard. Mater.* 166, 1429–1440. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.067>
- Gázquez, M.J., Bolívar, J.P., Vaca, F., García-Tenorio, R., Mena-Nieto, A., 2012. Use of the “red gypsum” industrial waste as substitute of natural gypsum for commercial cements manufacturing. *Mater. Constr.* 62, 183–198. <https://doi.org/10.3989/mc.2011.63910>
- Gerhardt, K.E., Gerwing, P.D., Greenberg, B.M., 2017. Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Sci.* 256, 170–185. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.11.016>
- Gielnik, A., Pechaud, Y., Huguenot, D., Cébron, A., Riou, J.-M., Guibaud, G., Esposito, G., van Hullebusch, E.D., 2019. Effect of digestate application on microbial respiration and bacterial communities’ diversity during bioremediation of weathered petroleum hydrocarbons contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 670, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.176>
- Gil-Loaiza, J., White, S.A., Root, R.A., Solís-Dominguez, F.A., Hammond, C.M., Chorover, J., Maier, R.M., 2016. Phytostabilization of mine tailings using compost-assisted direct planting: Translating greenhouse results to the field. *Sci. Total Environ.* 565, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.168>
- Gonzalez-Dugo, V., Zarco-Tejada, P., Nicolás, E., Nortes, P.A., Alarcón, J.J., Intrigliolo, D.S., Fereres, E., 2013. Using high resolution UAV thermal imagery to assess the variability in the water status of five fruit tree species within a commercial orchard. *Precis. Agric.* 14, 660–678. <https://doi.org/10.1007/s11119-013-9322-9>
- Goswami, A., Sharma, D., Mathuku, H., Gangadharan, S.M.P., Yadav, C.S., Sahu, S.K., Pradhan, M.K., Singh, J., Imran, H., 2022. Change Detection in Remote Sensing Image Data Comparing Algebraic and Machine Learning Methods. *Electronics* 11, 431. <https://doi.org/10.3390/electronics11030431>
- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S., Patra, J.K., 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* 206, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>

- Graham, A.M., Aiken, G.R., Gilmour, C.C., 2012. Dissolved Organic Matter Enhances Microbial Mercury Methylation Under Sulfidic Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2715–2723. <https://doi.org/10.1021/es203658f>
- Griffiths, B.S., Philippot, L., 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 112–129. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x>
- Grosjean, N., Le Jean, M., Armengaud, J., Schikora, A., Chalot, M., Gross, E.M., Blaudez, D., 2022. Combined omics approaches reveal distinct responses between light and heavy rare earth elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Hazard. Mater.* 425, 127830. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127830>
- Guichon, V., 2022. TiO₂ – Dioxyde de Titane – Process de fabrication du Dioxyde de titane [WWW Document]. URL <https://guichon-vannes.com/faqs/tio2-dioxyde-de-titane-process-de-fabrication-du-dioxyde-de-titane/> (accessed 4.11.22).
- Gunnarsson, A., Bengtsson, F., Caspersen, S., 2010. Use efficiency of nitrogen from biodigested plant material by ryegrass. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, 113–119. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800250>
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., Singh, V., 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* 7, 96–102.
- Gutleben, J., Chaib De Mares, M., van Elsas, J.D., Smidt, H., Overmann, J., Sipkema, D., 2018. The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate. *Crit. Rev. Microbiol.* 44, 212–229. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332003>
- Hashem, A., Tabassum, B., Fathi Abd_Allah, E., 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hassan, S.E., Hijri, M., St-Arnaud, M., 2013. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. *New Biotechnol., Biotechnology for the Bio and Green Economy* 30, 780–787. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.07.002>
- Honert, T.H. van den, 1948. Water transport in plants as a catenary process. *Discuss. Faraday Soc.* 3, 146–153. <https://doi.org/10.1039/DF9480300146>
- Houshmandfar, A., Fitzgerald, G.J., O’Leary, G., Tausz-Posch, S., Fletcher, A., Tausz, M., 2018. The relationship between transpiration and nutrient uptake in wheat changes under elevated atmospheric CO₂. *Physiol. Plant.* 163, 516–529. <https://doi.org/10.1111/ppl.12676>
- Huang, L., Baumgartl, T., Mulligan, D., 2012. Is rhizosphere remediation sufficient for sustainable revegetation of mine tailings? *Ann. Bot.* 110, 223–238. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs115>
- Huete, A.R., 1988. A soil-adjusted vegetation index (SAVI). *Remote Sens. Environ.* 25, 295–309. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(88\)90106-X](https://doi.org/10.1016/0034-4257(88)90106-X)
- Hughes, P.N., Glendinning, S., Manning, D. a. C., Noble, B.C., 2010. Production of ‘green’ concrete using red gypsum and waste. *Proc. Inst. Civ. Eng. - Eng. Sustain.* 163, 137–146. <https://doi.org/10.1680/ensu.2010.163.3.137>
- Huguet, S., Bert, V., Laboudigue, A., Barthès, V., Isaure, M.-P., Llorens, I., Schat, H., Sarret, G., 2012. Cd speciation and localization in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Environ. Exp. Bot.* 82, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.011>

- Hunt, E.R., Hively, W.D., Daughtry, C.S.T., McCarty, G.W., Fujikawa, S.J., Ng, T.L., Tranchitella, M., Linden, D.S., Yoel, D.W., Microsystems, I., Drive, T., 2008. REMOTE SENSING OF CROP LEAF AREA INDEX USING UNMANNED AIRBORNE VEHICLES 9.
- Hussain Lahori, A., Zhang, Z., Guo, Z., Mahar, A., Li, R., Kumar Awasthi, M., Ali Sial, T., Kumbhar, F., Wang, P., Shen, F., Zhao, J., Huang, H., 2017. Potential use of lime combined with additives on (im)mobilization and phytoavailability of heavy metals from Pb/Zn smelter contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.049>
- Insam, H., Gómez-Brandón, M., Ascher, J., 2015. Manure-based biogas fermentation residues – Friend or foe of soil fertility? *Soil Biol. Biochem.* 84, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.006>
- Jakobsen, S.T., 1993. Interaction between Plant Nutrients: IV. Interaction between Calcium and Phosphate. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* 43, 6–10. <https://doi.org/10.1080/09064719309410224>
- Janoušková, M., Pavlíková, D., Vosátka, M., 2006. Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere, Environmental Chemistry* 65, 1959–1965. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.007>
- Jedidi, N., Hassen, A., van Cleemput, O., M’Hiri, A., 2004. Microbial biomass in a soil amended with different types of organic wastes. *Waste Manag. Res. J. Int. Solid Wastes Public Clean. Assoc. ISWA* 22, 93–99. <https://doi.org/10.1177/0734242X04043930>
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.-M., 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Contrib. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Sustain. Maint. Plant Health Soil Fertil.* 37, 1–16.
- Jégo, G., Pattey, E., Liu, J., 2012. Using Leaf Area Index, retrieved from optical imagery, in the STICS crop model for predicting yield and biomass of field crops. *Field Crops Res.* 131, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.02.012>
- Jia, Y., Huang, H., Zhong, M., Wang, F.-H., Zhang, L.-M., Zhu, Y.-G., 2013. Microbial Arsenic Methylation in Soil and Rice Rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3141–3148. <https://doi.org/10.1021/es303649v>
- Jing, Y., He, Z., Yang, X., 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8, 192–207. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0192>
- Joint Research Centre, 2017. Large-scale physical and chemical land disturbance. *World Atlas Desertification*. <https://wad.jrc.ec.europa.eu/mining>
- Jones, B.E.H., Haynes, R.J., 2011. Bauxite Processing Residue: A Critical Review of Its Formation, Properties, Storage, and Revegetation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 271–315. <https://doi.org/10.1080/10643380902800000>
- Jones, H.G., 2013. *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511845727>
- Jones, H.G., 1998. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* 49, 387–398. https://doi.org/10.1093/jxb/49.Special_Issue.387
- Jordan, C.F., 1969. Derivation of Leaf-Area Index from Quality of Light on the Forest Floor. *Ecology* 50, 663–666. <https://doi.org/10.2307/1936256>

- Kabas, S., Faz, A., Acosta, J.A., Zornoza, R., Martínez-Martínez, S., Carmona, D.M., Bech, J., 2012. Effect of marble waste and pig slurry on the growth of native vegetation and heavy metal mobility in a mine tailing pond. *J. Geochem. Explor., Phytoremediation of polluted soils* 123, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.07.008>
- Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants, 4th ed. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Kashyap, B.K., Solanki, M.K., Pandey, A.K., Prabha, S., Kumar, P., Kumari, B., 2019. Bacillus as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Promising Green Agriculture Technology, in: Ansari, R.A., Mahmood, I. (Eds.), *Plant Health Under Biotic Stress: Volume 2: Microbial Interactions*. Springer, Singapore, pp. 219–236. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_11
- Kaufman, Y.J., Tanre, D., 1992. Atmospherically resistant vegetation index (ARVI) for EOS-MODIS. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* 30, 261–270. <https://doi.org/10.1109/36.134076>
- Kaur, N., Phillips, I., Fey, M.V., 2016. Amelioration of bauxite residue sand by intermittent additions of nitrogen fertiliser and leaching fractions: The effect on growth of kikuyu grass and fate of applied nutrients. *Sci. Total Environ.* 550, 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.012>
- Kaushal, M., Wani, S.P., 2016. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Ann. Microbiol.* 66, 35–42. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1112-3>
- Khairul, M.A., Zanganeh, J., Moghtaderi, B., 2019. The composition, recycling and utilisation of Bayer red mud. *Resour. Conserv. Recycl.* 141, 483–498. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.11.006>
- Khidir, H.H., Eudy, D.M., Porrás-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D.O., Sinsabaugh, R.L., 2010. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *J. Arid Environ.* 74, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.07.014>
- Kobae, Y., 2019. Dynamic Phosphate Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Under Field Conditions. *Front. Environ. Sci.* 6.
- Kochian, L.V., 1991. Mechanisms of Micronutrient Uptake and Translocation in Plants, in: Mortvedt, J.J. (Ed.), *SSSA Book Series*. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 229–296. <https://doi.org/10.2136/sssabookser4.2ed.c8>
- Koide, R.T., Kabir, Z., 2000. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol.* 148, 511–517. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00776.x>
- Komesli, S., Akbulut, S., Arslan, N.P., Adiguzel, A., Taskin, M., 2020. Waste frying oil hydrolysis and lipase production by cold-adapted *Pseudomonas yamanorum* LP2 under non-sterile culture conditions. *Environ. Technol.* 42, 3245–3253. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1745297>
- Kossoff, D., Dubbin, W.E., Alfredsson, M., Edwards, S.J., Macklin, M.G., Hudson-Edwards, K.A., 2014. Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. *Appl. Geochem.* 51, 229–245. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.09.010>
- Kriegler, F.J., Malila, W.A., Nalepka, R.F., Richardson, W., 1969. Preprocessing Transformations and Their Effects on Multispectral Recognition. Presented at the Remote Sensing of Environment, VI.

- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C., 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Manag.* 28, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012>
- Leifeld, J., Siebert, S., Kögel-Knabner, I., 2002. Biological activity and organic matter mineralization of soils amended with biowaste composts. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 151–159. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200204\)165:2<151::AID-JPLN151>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200204)165:2<151::AID-JPLN151>3.0.CO;2-T)
- Levén, L., 2006. Anaerobic Digestion at Mesophilic and Thermophilic Temperature 48.
- Lewis, J., Qvarfort, U., Sjöström, J., 2015. *Betula pendula*: A Promising Candidate for Phytoremediation of TCE in Northern Climates. *Int. J. Phytoremediation* 17, 9–15. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.828012>
- Li, J., Pei, Y., Zhao, S., Xiao, R., Sang, X., Zhang, C., 2020. A Review of Remote Sensing for Environmental Monitoring in China. *Remote Sens.* 12, 1130. <https://doi.org/10.3390/rs12071130>
- Liang, P., Fang, X., Hu, Y., Yuan, M., Raba, D.A., Ding, J., Bunn, D.C., Sanjana, K., Yang, J., Rosas-Lemus, M., Häse, C.C., Tuz, K., Juárez, O., 2020. The aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* cultured in artificial urine media: Role of NQR and terminal oxidases. *PLOS ONE* 15, e0231965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231965>
- Liang, Y., Yang, Y., Yang, C., Shen, Q., Zhou, J., Yang, L., 2003. Soil enzymatic activity and growth of rice and barley as influenced by organic manure in an anthropogenic soil. *Geoderma, Anthropogenic soils and their use in China: Anthropogenic soils and soil quality change under intensive management in China* 115, 149–160. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(03\)00084-3](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(03)00084-3)
- Lin, L., Yu, K., Yao, X., Deng, Y., Hao, Z., Chen, Y., Wu, N., Liu, J., 2021. UAV Based Estimation of Forest Leaf Area Index (LAI) through Oblique Photogrammetry. *Remote Sens.* 13, 803. <https://doi.org/10.3390/rs13040803>
- Liu, M., Hu, F., Chen, X., Huang, Q., Jiao, J., Zhang, B., Li, H., 2009. Organic amendments with reduced chemical fertilizer promote soil microbial development and nutrient availability in a subtropical paddy field: The influence of quantity, type and application time of organic amendments. *Appl. Soil Ecol.* 42, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.03.006>
- Lošák, T., Musilová, L., Zatloukalová, A., Szostková, M., Hlušek, J., Fryč, J., Vítěz, T., Haitl, M., von Bennewitz, E., Martensson, A., 2012. Digestate is equal or a better alternative to mineral fertilization of kohlrabi. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.* 60, 91–96. <https://doi.org/10.11118/actaun201260010091>
- Lu, H., Fan, T., Ghimire, P., Deng, L., 2020. Experimental Evaluation and Consistency Comparison of UAV Multispectral Minisensors. *Remote Sens.* 12, 2542. <https://doi.org/10.3390/rs12162542>
- Lu, L., Tian, S., Zhang, J., Yang, X., Labavitch, J.M., Webb, S.M., Latimer, M., Brown, P.H., 2013. Efficient xylem transport and phloem remobilization of Zn in the hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii*. *New Phytol.* 198, 721–731. <https://doi.org/10.1111/nph.12168>
- Lyyra, S., Meagher, R.B., Kim, T., Heaton, A., Montello, P., Balish, R.S., Merkle, S.A., 2007. Coupling two mercury resistance genes in Eastern cottonwood enhances the processing of organomercury. *Plant Biotechnol. J.* 5, 254–262. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00236.x>

- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., Freitas, H., 2016. Inoculation of *Brassica oxyrrhina* with plant growth promoting bacteria for the improvement of heavy metal phytoremediation under drought conditions. *J. Hazard. Mater.* 320, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.009>
- Maiti, S.K., 2012. *Ecorestoration of the coalmine degraded lands*. Springer Science & Business Media.
- Makádi, M., Tomócsik, A., Orosz, V., 2012. Digestate: A New Nutrient Source - Review. pp. 295–310. <https://doi.org/10.5772/31355>
- Mandyam, K., Jumpponen, A., 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud. Mycol., The Missing Lineages: Phylogeny and ecology of endophytic and other enigmatic root-associated fungi* 53, 173–189. <https://doi.org/10.3114/sim.53.1.173>
- Manzanera, M., Narváez-Reinaldo, J.J., García-Fontana, C., Vílchez, J.I., González-López, J., 2015. Genome Sequence of *Arthrobacter koreensis* 5J12A, a Plant Growth-Promoting and Desiccation-Tolerant Strain. *Genome Announc.* 3, e00648-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00648-15>
- Markwell, J., Osterman, J.C., Mitchell, J.L., 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynth. Res.* 46, 467–472. <https://doi.org/10.1007/BF00032301>
- Marschner, H., 2011. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press.
- Masle, J., Farquahar, G.D., Wong, S.C., 1992. Transpiration ratio and plant mineral content are related among genotypes of a range of species. *Aust. J. Plant Physiol. Aust.*
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegheuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., 2007a. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Exp. Bot.* 60, 385–396. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.12.010>
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Tack, F.M.G., 2007b. Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environ. Exp. Bot.* 60, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.06.008>
- Mench, M., Schwitzguébel, J.-P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., Gupta, S., 2009. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 876. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0252-z>
- Mench, M.J., Dellise, M., Bes, C.M., Marchand, L., Kolbas, A., Le Coustumer, P., Oustrière, N., 2018. Phytomanagement and Remediation of Cu-Contaminated Soils by High Yielding Crops at a Former Wood Preservation Site: Sunflower Biomass and Ionome. *Front. Ecol. Evol.* 6, 123. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00123>
- Mendez, M.O., Maier, R.M., 2008. Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments—An Emerging Remediation Technology. *Environ. Health Perspect.* 116, 278–283. <https://doi.org/10.1289/ehp.10608>
- Mertens, J., Van Nevel, L., De Schrijver, A., Piesschaert, F., Oosterbaan, A., Tack, F.M.G., Verheyen, K., 2007. Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environ. Pollut.* 149, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.002>

- Möller, K., Müller, T., 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Eng. Life Sci.* 12, 242–257. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100085>
- Montemurro, F., Vitti, C., Diacono, M., Canali, S., Tittarelli, F., Ferri, D., 2010. A three-year field anaerobic digestates application: Effects on fodder crops performance and soil properties. *Fresenius Environ. Bull.* 19, 2087–2093.
- Mueller, N.C., Nowack, B., 2010. Nanoparticles for Remediation: Solving Big Problems with Little Particles. *Elements* 6, 395–400. <https://doi.org/10.2113/gselements.6.6.395>
- Muszyńska, E., Labudda, M., 2019. Dual Role of Metallic Trace Elements in Stress Biology—From Negative to Beneficial Impact on Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3117. <https://doi.org/10.3390/ijms20133117>
- Naidu, R., 2013. Global Contamination Initiative. crccare CRCCAREGRCIbrochure2, 8.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Navulur, K., 2006. *Multispectral Image Analysis Using the Object-Oriented Paradigm*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781420043075>
- Nedjimi, B., 2021. Phytoremediation: a sustainable environmental technology for heavy metals decontamination. *SN Appl. Sci.* 3, 286. <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04301-4>
- Nesvizhskii, A.I., 2014. Proteogenomics: concepts, applications, and computational strategies. *Nat. Methods* 11, 1114–1125. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3144>
- Nwoko, C.O., 2010. Trends in phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants 7.
- Nyberg, K., Sundh, I., Johansson, M., Schnürer, A., 2004. Presence of potential ammonia oxidation (PAO) inhibiting substances in anaerobic digestion residues. *Appl. Soil Ecol.* 26, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.12.002>
- O'Connor, B., 2014. L'utilisation de la télédétection pour mesurer et faire le suivi de la biodiversité et services écosystémiques. PNUE-WCMC.
- Odlare, M., 2005. Organic residues - a resource for arable soils [WWW Document]. URL <https://pub.epsilon.slu.se/913/> (accessed 3.9.22).
- Odlare, M., Pell, M., Svensson, K., 2008. Changes in soil chemical and microbiological properties during 4 years of application of various organic residues. *Waste Manag.* 28, 1246–1253. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.06.005>
- Page, V., Bayon, R.-C.L., Feller, U., 2006. Partitioning of zinc, cadmium, manganese and cobalt in wheat (*Triticum aestivum*) and lupin (*Lupinus albus*) and further release into the soil. *Environ. Exp. Bot.* 58, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.09.005>
- Page, V., Blösch, R.M., Feller, U., 2012. Regulation of shoot growth, root development and manganese allocation in wheat (*Triticum aestivum*) genotypes by light intensity. *Plant Growth Regul.* 67, 209–215. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9679-1>
- Page, V., Feller, U., 2015. Heavy Metals in Crop Plants: Transport and Redistribution Processes on the Whole Plant Level. *Agronomy* 5, 447–463. <https://doi.org/10.3390/agronomy5030447>
- Page, V., Feller, U., 2005. Selective Transport of Zinc, Manganese, Nickel, Cobalt and Cadmium in the Root System and Transfer to the Leaves in Young Wheat Plants. *Ann. Bot.* 96, 425–434. <https://doi.org/10.1093/aob/mci189>

- Palansooriya, K.N., Shaheen, S.M., Chen, S.S., Tsang, D.C.W., Hashimoto, Y., Hou, D., Bolan, N.S., Rinklebe, J., Ok, Y.S., 2020. Soil amendments for immobilization of potentially toxic elements in contaminated soils: A critical review. *Environ. Int.* 134, 105046. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105046>
- Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y., Montanarella, L., 2013. Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *J. Environ. Public Health* 2013, e158764. <https://doi.org/10.1155/2013/158764>
- Pandey, N., Sharma, C.P., 2003. Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environ. Exp. Bot.* 49, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00088-6)
- Parra, S., Bravo, M.A., Quiroz, W., Moreno, T., Karanasiou, A., Font, O., Vidal, V., Cereceda, F., 2014. Distribution of trace elements in particle size fractions for contaminated soils by a copper smelting from different zones of the Puchuncaví Valley (Chile). *Chemosphere* 111, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.127>
- Pascale, A., Proietti, S., Pantelides, I.S., Stringlis, I.A., 2020. Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. *Front. Plant Sci.* 10.
- Pasta, S., de Rigo, D., Caudullo, G., 2016. *Ostrya carpinifolia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats 2.
- Peacock, S., Rimmer, D.L., 2000. The Suitability of an Iron Oxide-Rich Gypsum By-Product as a Soil Amendment. *J. Environ. Qual.* 29, 1969–1975. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900060033x>
- Pedas, P., Husted, S., Skytte, K., Schjoerring, J., 2011. Elevated phosphorus impedes manganese acquisition by barley plants. *Front. Plant Sci.* 2.
- Pezeshki, S.R., DeLaune, R.D., 2012. Soil Oxidation-Reduction in Wetlands and Its Impact on Plant Functioning. *Biology* 1, 196–221. <https://doi.org/10.3390/biology1020196>
- Phillips, D.P., Human, L.R.D., Adams, J.B., 2015. Wetland plants as indicators of heavy metal contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 92, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.038>
- Prieto, I., Armas, C., Pugnaire, F.I., 2012. Water release through plant roots: new insights into its consequences at the plant and ecosystem level. *New Phytol.* 193, 830–841. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04039.x>
- Qasim, B., Motelica-Heino, M., Bourgerie, S., Gauthier, A., Morabito, D., 2016. Rhizosphere effects of *Populus euramericana* Dorskamp on the mobility of Zn, Pb and Cd in contaminated technosols. *J. Soils Sediments* 16, 811–820. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1270-8>
- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, J.N., El Aalaoui, M., Akroud, H., Amarraque, A., Vaerenbergh, J.V., Tahzima, R., Mayad, E.H., Chebli, B., 2019. Applications of New Rhizobacteria *Pseudomonas* Isolates in Agroecology via Fundamental Processes Complementing Plant Growth. *Sci. Rep.* 9, 12832. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8>
- QGIS Development Team, 2018. QGIS Geographic Information System: Open Source Geospatial Foundation Project.
- Qi, J., Chehbouni, A., Huete, A.R., Kerr, Y.H., Sorooshian, S., 1994. A modified soil adjusted vegetation index.

- R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28, 142–9. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30, 1562–1574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>
- Raklami, A., Bechtaoui, N., Tahiri, A., Anli, M., Meddich, A., Oufdou, K., 2019. Use of Rhizobacteria and Mycorrhizae Consortium in the Open Field as a Strategy for Improving Crop Nutrition, Productivity and Soil Fertility. *Front. Microbiol.* 10.
- Rashid, M.I., Mujawar, L.H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I.M.I., Oves, M., 2016. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiol. Res.* 183, 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007>
- Rauhala, A., Tuomela, A., Davids, C., Rossi, P.M., 2017. UAV Remote Sensing Surveillance of a Mine Tailings Impoundment in Sub-Arctic Conditions. *Remote Sens.* 9, 1318. <https://doi.org/10.3390/rs9121318>
- Raza, A., Habib, M., Kakavand, S.N., Zahid, Z., Zahra, N., Sharif, R., Hasanuzzaman, M., 2020. Phytoremediation of Cadmium: Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms. *Biology* 9, 177. <https://doi.org/10.3390/biology9070177>
- Reddy, C.A., Saravanan, R.S., 2013. Chapter Three - Polymicrobial Multi-functional Approach for Enhancement of Crop Productivity, in: Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 53–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00003-X>
- Regvar, M., Likar, M., Piltaver, A., Kugonič, N., Smith, J.E., 2010. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant Soil* 330, 345–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0207-7>
- Rengel, Z., Marschner, P., 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: Exploiting genotypic differences. *New Phytol.* 168, 305–12. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01558.x>
- Riesen, O., Feller, U., 2005. Redistribution of Nickel, Cobalt, Manganese, Zinc, and Cadmium via the Phloem in Young and Maturing Wheat. *J. Plant Nutr.* 28, 421–430. <https://doi.org/10.1081/PLN-200049153>
- Rosli, N.A., Aziz, H.A., Selamat, M.R., Lim, L.L.P., 2020. A mixture of sewage sludge and red gypsum as an alternative material for temporary landfill cover. *J. Environ. Manage.* 263, 110420. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110420>
- Rüth, B., Lennartz, B., Kahle, P., 2007. Water regime of mechanical—biological pretreated waste materials under fast-growing trees. *Waste Manag. Res.* 25, 408–416. <https://doi.org/10.1177/0734242X07076940>
- Sacristán, D., González-Guzmán, A., Barrón, V., Torrent, J., Del Campillo, M.C., 2019. Phosphorus-induced zinc deficiency in wheat pot-grown on noncalcareous and calcareous soils of different properties. *Arch. Agron. Soil Sci.* 65, 208–223. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1492714>

- Sarwar, N., Saifullah, Malhi, S.S., Zia, M.H., Naeem, A., Bibi, S., Farid, G., 2010. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *J. Sci. Food Agric.* 90, 925–937. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3916>
- Schlegel, H.G., Gottschalk, G., Bartha, R.V., 1961. FORMATION AND UTILIZATION OF POLY- γ -HYDROXYBUTYRIC ACID BY KNALLGAS BACTERIA (HYDROGENOMONAS) 3.
- Scholz, F.G., Bucci, S.J., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Miralles-Wilhelm, F., 2007. Removal of nutrient limitations by long-term fertilization decreases nocturnal water loss in savanna trees. *Tree Physiol.* 27, 551–559. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.4.551>
- Schulz, B., Boyle, C., 2006. What are Endophytes?, in: Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C., Sieber, T.N. (Eds.), *Microbial Root Endophytes*, Soil Biology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–13. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_1
- Sellin, A., Tullus, A., Niglas, A., Öunapuu-Pikas, E., Meitern, A., Löhmus, K., 2013. Humidity-driven changes in growth rate, photosynthetic capacity, hydraulic properties and other functional traits in silver birch (*Betula pendula*). *Ecol. Res.* 28, 523–535. <https://doi.org/10.1007/s11284-013-1041-1>
- Shahmoradi, J., Talebi, E., Roghanchi, P., Hassanalian, M., 2020. A Comprehensive Review of Applications of Drone Technology in the Mining Industry. *Drones* 4, 34. <https://doi.org/10.3390/drones4030034>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., M, R., Sidhu, G.P.S., Bali, A., Handa, N., Kapoor, D., Yadav, P., Khanna, K., Bakshi, P., Rehman, A., Kohli, S., Khan, E., Parihar, R., Yuan, H., Thukral, A., Bhardwaj, R., Zheng, B., 2020. Photosynthetic Response of Plants Under Different Abiotic Stresses: A Review. *J. Plant Growth Regul.* 39, 509–531. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10018-x>
- Shim, D., Kim, S., Choi, Y.-I., Song, W.-Y., Park, J., Youk, E.S., Jeong, S.-C., Martinoia, E., Noh, E.-W., Lee, Y., 2013. Transgenic poplar trees expressing yeast cadmium factor 1 exhibit the characteristics necessary for the phytoremediation of mine tailing soil. *Chemosphere* 90, 1478–1486. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.044>
- Smith, S.E., Read, D.J., 2010. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.
- Soleimani, M., Afyuni, M., Hajabbasi, M.A., Nourbakhsh, F., Sabzalian, M.R., Christensen, J.H., 2010. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* 81, 1084–1090. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.034>
- Song, B., Xu, P., Chen, M., Tang, W., Zeng, G., Gong, J., Zhang, P., Ye, S., 2019. Using nanomaterials to facilitate the phytoremediation of contaminated soil. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 49, 791–824. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1558891>
- Song, Wen, Song, Wei, Gu, H., Li, F., 2020. Progress in the Remote Sensing Monitoring of the Ecological Environment in Mining Areas. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 1846. <https://doi.org/10.3390/ijerph17061846>
- Stinner, W., Möller, K., Leithold, G., 2008. Effects of biogas digestion of clover/grass-leys, cover crops and crop residues on nitrogen cycle and crop yield in organic stockless farming systems. *Eur. J. Agron.* 29, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.04.006>
- Stoms, D.M., Estes, J.E., 1993. A remote sensing research agenda for mapping and monitoring biodiversity. *Int. J. Remote Sens.* 14, 1839–1860. <https://doi.org/10.1080/01431169308954007>

- Suman, J., Uhlik, O., Viktorova, J., Macek, T., 2018. Phytoextraction of Heavy Metals: A Promising Tool for Clean-Up of Polluted Environment? *Front. Plant Sci.* 9, 1476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01476>
- Sun, S.-L., Yang, W.-L., Fang, W.-W., Zhao, Y.-X., Guo, L., Dai, Y.-J., 2018. The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 Regulates the Level of Indole-3-Acetic Acid Synthesized from Indole-3-Acetonitrile. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00298-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00298-18>
- Sun, Y., Sun, P., Xue, J., Du, Y., Yan, H., Wang, L., Yi, X., Sun, J., Zhang, X., Gao, J., 2022. *Arthrobacter wenxiniae* sp. nov., a novel plant growth-promoting rhizobacteria species harbouring a carotenoids biosynthetic gene cluster. *Antonie Van Leeuwenhoek* 115, 353–364. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01701-9>
- Suz, L.M., Barsoum, N., Benham, S., Cheffings, C., Cox, F., Hackett, L., Jones, A.G., Mueller, G.M., Orme, D., Seidling, W., Van Der Linde, S., Bidartondo, M.I., 2015. Monitoring ectomycorrhizal fungi at large scales for science, forest management, fungal conservation and environmental policy. *Ann. For. Sci.* 72, 877–885. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0447-4>
- Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., 2011. A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.* 2011, e939161. <https://doi.org/10.1155/2011/939161>
- Tardella, F.M., Postiglione, N., Tavoloni, M., Catorci, A., 2019. Changes in species and functional composition in the herb layer of sub-Mediterranean *Ostrya carpinifolia* abandoned coppices. *Plant Ecol.* 220, 1043–1055. <https://doi.org/10.1007/s11258-019-00973-6>
- Tavanti, R.F.R., David Queiroz, G., Caroline Da Rocha Silva, A., Moya Peres, W., Pereira Paixão, A., Galindo, F.S., Martins Silva, V., Bossolani, J.W., Moreira Melero, M., De Souza Oliveira, G., Furlani Júnior, E., Dos Reis, A.R., 2019. Changes in photosynthesis and antioxidant metabolism of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants in response to manganese stress. *Arch. Agron. Soil Sci.* 1–20. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1637857>
- Tayibi, S., Monlau, F., Marias, F., Cazaudehore, G., Fayoud, N.-E., Oukarroum, A., Zeroual, Y., Barakat, A., 2021. Coupling anaerobic digestion and pyrolysis processes for maximizing energy recovery and soil preservation according to the circular economy concept. *J. Environ. Manage.* 279, 111632. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111632>
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment, in: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 3: Environmental Toxicology, Experientia Supplementum*. Springer, Basel, pp. 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- TDMA, 2013. The Carbon Footprint of Titanium Dioxide Pigment. European Chemical Industry Council.
- Thanh-Nho, N., Marchand, C., Strady, E., Vinh, T.-V., Nhu-Trang, T.-T., 2019. Metals geochemistry and ecological risk assessment in a tropical mangrove (Can Gio, Vietnam). *Chemosphere* 219, 365–382. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.163>
- Thenkabail, P.S., Mariotto, I., Gumma, M.K., Middleton, E.M., Landis, D.R., Huemmrich, K.F., 2013. Selection of Hyperspectral Narrowbands (HNBS) and Composition of Hyperspectral Twoband Vegetation Indices (HVIs) for Biophysical Characterization and Discrimination of Crop Types Using Field Reflectance and Hyperion/EO-1 Data.

- IEEE J. Sel. Top. Appl. Earth Obs. Remote Sens. 6, 427–439. <https://doi.org/10.1109/JSTARS.2013.2252601>
- Tian, J., Wang, L., Li, X., Gong, H., Shi, C., Zhong, R., Liu, X., 2017. Comparison of UAV and WorldView-2 imagery for mapping leaf area index of mangrove forest. *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinformation* 61, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.jag.2017.05.002>
- Tinker, P.B., Nye, P., 2000. *Solute Movement in the Rhizosphere*, Second Edition. ed, Topics in Sustainable Agronomy. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Tucker, C.J., 1979. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sens. Environ.* 8, 127–150. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(79)90013-0)
- Tuomisto, H., Linna, A., Kalliola, R., 1994. Use of digitally processed satellite images in studies of tropical rain forest vegetation. *Int. J. Remote Sens.* 15, 1595–1610. <https://doi.org/10.1080/01431169408954194>
- Tuzet, A.J., 2011. Stomatal Conductance, Photosynthesis, and Transpiration, Modeling, in: Gliński, J., Horabik, J., Lipiec, J. (Eds.), *Encyclopedia of Agrophysics*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 855–858. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3585-1_213
- Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F.H., Fahad, S., Yang, X., 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environ. Exp. Bot.* 117, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.001>
- Unyayar, S., Celik, A., Cekiç, F.O., Gözel, A., 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis* 21, 77–81. <https://doi.org/10.1093/mutage/gel001>
- Usuki, F., Narisawa, K., 2007. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia* 99, 175–184. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832577>
- Van Belleghem, F., Cuypers, A., Semane, B., Smeets, K., Vangronsveld, J., d’Haen, J., Valcke, R., 2007. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 173, 495–508. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01940.x>
- van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil* 362, 319–334. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3>
- Verdugo, C., Sánchez, P., Santibañez, C., Urrestarazu, P., Bustamante, E., Silva, Y., Gourdon, D., Ginocchio, R., 2011. Efficacy of Lime, Biosolids, and Mycorrhiza for the Phytostabilization of Sulfidic Copper Tailings in Chile: A Greenhouse Experiment. *Int. J. Phytoremediation* 13, 107–25. <https://doi.org/10.1080/15226510903535056>
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A., 2007. Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere* 68, 1563–1575. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.052>
- Viteri, V.S. de, Fuentes, E., 2013. Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials, *Tribology - Fundamentals and Advancements*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/55860>
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376–387.
- Wang, B., Yeun, L.H., Xue, J.-Y., Liu, Y., Ané, J.-M., Qiu, Y.-L., 2010. Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of

- mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytol.* 186, 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03137.x>
- Werner, T.T., Bebbington, A., Gregory, G., 2019. Assessing impacts of mining: Recent contributions from GIS and remote sensing. *Extr. Ind. Soc.* 6, 993–1012. <https://doi.org/10.1016/j.exis.2019.06.011>
- Wierzbicki, D., 2018. Multi-Camera Imaging System for UAV Photogrammetry. *Sensors* 18, 2433. <https://doi.org/10.3390/s18082433>
- Xian, Y., Wang, M., Chen, W., 2015. Quantitative assessment on soil enzyme activities of heavy metal contaminated soils with various soil properties. *Chemosphere* 139, 604–608. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.060>
- Xu, J., Wu, B., Ryu, D., Yan, N., Zhu, W., Ma, Z., 2021. A canopy conductance model with temporal physiological and environmental factors. *Sci. Total Environ.* 791, 148283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148283>
- Xu, X., Shi, J., Chen, Y., Chen, X., Wang, H., Perera, A., 2006. Distribution and mobility of manganese in the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Plant Soil* 285, 323–331. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9018-2>
- Xue, J., Su, B., 2017. Significant Remote Sensing Vegetation Indices: A Review of Developments and Applications. *J. Sens.* 2017, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2017/1353691>
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S.N., Mohd Yusof, M.L., Ghosh, S., Chen, Z., 2020. Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Front. Plant Sci.* 11.
- Yao, X., Wang, N., Liu, Y., Cheng, T., Tian, Y., Chen, Q., Zhu, Y., 2017. Estimation of Wheat LAI at Middle to High Levels Using Unmanned Aerial Vehicle Narrowband Multispectral Imagery. *Remote Sens.* 9, 1304. <https://doi.org/10.3390/rs9121304>
- Yoder, B.J., Pettigrew-Crosby, R.E., 1995. Predicting nitrogen and chlorophyll content and concentrations from reflectance spectra (400–2500 nm) at leaf and canopy scales. *Remote Sens. Environ.* 53, 199–211. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(95\)00135-N](https://doi.org/10.1016/0034-4257(95)00135-N)
- Zapata-Carbonell, J., Bégeot, C., Carry, N., Choulet, F., Delhaultal, P., Gillet, F., Girardclos, O., Mouly, A., Chalot, M., 2019. Spontaneous ecological recovery of vegetation in a red gypsum landfill: *Betula pendula* dominates after 10 years of inactivity. *Ecol. Eng.* 132, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.03.013>
- Zapata-Carbonell, J., Ciadamidaro, L., Parelle, J., Chalot, M., Tatin-Froux, F., 2020. Improving Silver Birch (*Betula pendula*) Growth and Mn Accumulation in Residual Red Gypsum Using Organic Amendments. *Front. Environ. Sci.* 8, 24. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00024>
- Zappelini, C., Alvarez-Lopez, V., Capelli, N., Guyeux, C., Chalot, M., 2018. *Streptomyces* Dominate the Soil Under *Betula* Trees That Have Naturally Colonized a Red Gypsum Landfill. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01772>
- Zarco-Tejada, P.J., González-Dugo, V., Berni, J.A.J., 2012. Fluorescence, temperature and narrow-band indices acquired from a UAV platform for water stress detection using a micro-hyperspectral imager and a thermal camera. *Remote Sens. Environ.* 117, 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2011.10.007>
- Zhang, J., Yan, Y., Hu, Z., Xie, X., Yang, L., 2019. Properties and hydration behavior of Ti-extracted residues-red gypsum based cementitious materials. *Constr. Build. Mater.* 218, 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.05.099>

- Zhang, S., Jiang, Q., Liu, X., Liu, L., Ding, W., 2020. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Alleviate Aluminum Toxicity and Ginger Bacterial Wilt in Acidic Continuous Cropping Soil. *Front. Microbiol.* 11.
- Zhang, X., Zhu, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Liu, S., Guo, J., Li, R., Wu, S., Chen, B., 2014. Growth and metal uptake of energy sugarcane (*Saccharum* spp.) in different metal mine tailings with soil amendments. *J. Environ. Sci.* 26, 1080–1089. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60543-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60543-4)
- Zheng, G., Moskal, L.M., 2009. Retrieving Leaf Area Index (LAI) Using Remote Sensing: Theories, Methods and Sensors. *Sensors* 9, 2719–2745. <https://doi.org/10.3390/s90402719>
- Zhu, F., Kong, X., Wu, C., Huang, L., Nan, H., Hartley, W., 2015. A review of the characterization and revegetation of bauxite residues (Red mud). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4558-8>
- Zulueta-Rodriguez, R., Cordoba-Matson, M.V., Hernandez-Montiel, L.G., Murillo-Amador, B., Rueda-Puente, E., Lara, L., 2014. Effect of *Pseudomonas putida* on Growth and Anthocyanin Pigment in Two Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) Cultivars. *Sci. World J.* 2014, e810192. <https://doi.org/10.1155/2014/810192>

Titre : Revégétalisation et biodynamisation d'un terri de sous-produits industriels par le phytomanagement.

Mots clés : Eléments traces, Manganèse, Terri de gypse rouge, Phytostabilisation, Digestat, *Pseudomonas sp*, Télé-détection par drone, Transpiration, *Ostrya carpinifolia*, *Betula pendula*.

Résumé : Les activités industrielles peuvent produire d'énormes quantités des sous-produits résiduels comme le gypse rouge issu de la production de TiO₂, qui présentent des conditions physico-chimiques défavorables à la croissance des plantes, notamment des concentrations élevées en éléments traces métalliques, une faible teneur en nutriments, un pH élevé et une pauvre diversité microbienne. L'objectif applicatif de ce projet de thèse était donc de proposer des pistes pour la revitalisation d'un terri de sous-produits industriels issue de l'usine TRONOX France, par la mise en œuvre d'une démarche de revégétalisation et biodynamisation. L'objectif scientifique général était alors la recherche d'une combinaison optimale « substrat / amendement / espèce végétale » pour favoriser les conditions d'une meilleure revégétalisation. Ce travail de phytomanagement, à partir de plusieurs approches transdisciplinaires (l'écophysiologie végétale, l'agronomie, la télé-détection, et la microbiologie), combine des essais *in-situ* et des expériences en mésocosme au laboratoire afin de répondre aux différents enjeux du site et objectifs scientifiques spécifiques. Nous avons d'abord testé la biodynamisation du substrat par des amendements organique (digestat) et biologique (inoculum bactérien) pour favoriser la phytostabilisation des ETM. Le digestat a amélioré les fonctionnalités du sol évaluées à partir des activités enzymatiques, et augmenté significativement la biomasse de *Betula pendula*. Le digestat a aussi augmenté la teneur en nutriment P et K des feuilles, et a diminué en revanche la teneur en ETM notamment Fe, Mn et Zn des feuilles. Ensuite, nous avons évalué la capacité de transpiration des 16 espèces végétales afin de pouvoir accroître le potentiel d'évapotranspiration sur le site d'Ochsenfeld. *Ostrya carpinifolia* a été l'espèce qui combine les valeurs les plus élevées de la croissance, de l'absorption de Mn, et de la conductance de la canopée déduite de la conductance stomatique et de LAI obtenue à l'aide de la télé-détection par drone. Enfin, nous avons étudié les caractéristiques fonctionnelles et protéogénomiques d'un isolat de *Pseudomonas sp* à haute capacité de solubilisation de Mn, pour mieux comprendre les mécanismes de transfert de Mn dans le continuum sol-plantes. Finalement, l'amendement de gypse rouge par le digestat et des isolats bactériens capables de solubiliser le Mn pourrait être proposé comme une stratégie efficace pour la revégétalisation des terrils par *Ostrya carpinifolia* et d'autres espèces d'arbres tolérantes, dans une approche de phytomanagement.

Title: Revegetation and biodynamisation of an industrial by-product landfill by phytomanagement.

Keywords: Trace elements, Manganese, Red gypsum landfill, Phytostabilisation, Digestate, *Pseudomonas sp*, UAV remote sensing, Transpiration, *Ostrya carpinifolia*, *Betula pendula*.

Abstract: Industrial activities can produce huge quantities of residual by-products such as red gypsum from TiO₂ production, which present unfavorable physico-chemical conditions for plant growth, including high concentrations of trace elements, low nutrient content, high pH and poor microbial diversity. The application objective of this thesis project was therefore to propose ways to revitalize a landfill of industrial by-products from the TRONOX France plant, by implementing a revegetation and biodynamisation approach. The general scientific objective was the search for an optimal combination of "substrate / amendment / plant species" to promote the conditions to better revegetation. This phytomanagement study, based on several transdisciplinary approaches (plant ecophysiology, agronomy, remote sensing, and microbiology), combines *in-situ* essay and mesocosm experiments in order to address the different site issues and specific scientific objectives. We first tested the biodynamisation of the substrate with organic (digestate) and biological (bacterial inoculum) amendments to promote phytostabilisation of TE. The digestate had improved soil functionalities assessed from enzymatic activities, and significantly increased the biomass of *Betula pendula*. The digestate also increased the P and K nutrient content of the leaves, while decreasing the content of TE such as Fe, Mn and Zn in the leaves. Next, we evaluated the transpiration capacity of the 16 plant species in order to increase the evapotranspiration potential at the Ochsenfeld site. *Ostrya carpinifolia* was the species that combined the highest values of growth, Mn uptake, and canopy conductance deduced from stomatal conductance and LAI obtained using UAV remote sensing. Finally, we investigated the functional and proteogenomic characteristics of a *Pseudomonas sp* isolate with high Mn-solubilisation capacity, to better understand the mechanisms of Mn transfer in the soil-plant continuum. Therefore, the amendment of red gypsum with digestate and bacterial isolates capable of solubilising Mn could be proposed as an effective strategy for revegetation of landfills by *Ostrya carpinifolia* and other tolerant tree species, in a phytomanagement approach.