



HAL
open science

Application of red mud (iron sludge) on heavy metal polluted soils in Berlin: promote biodiversity through the establishment of a native and sustainable vegetation, while limiting the risk of pollutant dispersion via phytostabilisation

Énora Ars

► **To cite this version:**

Énora Ars. Application of red mud (iron sludge) on heavy metal polluted soils in Berlin: promote biodiversity through the establishment of a native and sustainable vegetation, while limiting the risk of pollutant dispersion via phytostabilisation. Life Sciences [q-bio]. 2023. dumas-04281970

HAL Id: dumas-04281970

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04281970>

Submitted on 13 Nov 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.

<p>Année universitaire : 2022 – 2023</p> <p>Spécialité :</p> <p><i>Ingénieur agronome ESA</i></p> <p>Spécialisation (et option éventuelle) :</p> <p><i>Horticulture : I2PH</i></p>	<p>Mémoire de fin d'études</p> <p><input type="checkbox"/> d'ingénieur de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)</p> <p><input type="checkbox"/> de master de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)</p> <p><input type="checkbox"/> de l'Institut Agro Montpellier (étudiant arrivé en M2)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)</p>
--	--

Application of red mud (iron sludge) on heavy metal polluted soils in Berlin :

→Promote biodiversity through the establishment of a native and sustainable vegetation, while limiting the risk of pollutant dispersion via phytostabilisation.

→Favoriser la biodiversité par l'installation durable d'une végétation d'origine locale, tout en limitant les risques de diffusion des polluants grâce à la phytostabilisation.

Par : Enora ARS



Soutenu à Angers le 29 septembre 2023

Devant le jury composé de :

Président : Etienne Chantoiseau

Autres membres du jury : Vincent Guérin

Maître de stage : Holger Beßler

Joëlle Fustec (ESA)

Enseignant référent : Soulaïman Sakr

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation «Patrimoine-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France» disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Acknowledgments

I want to express my gratitude to Pr. Dr. E. George without whom this internship wouldn't have been possible, thank you for this great learning opportunity.

May thanks to Holger, you are a fountain of knowledge and I am very grateful for your help and trust during the different phases of this experiment. Thank you for being patient as well, even though I have the time management skills of a carrot.

I also want to extend my thanks to the whole Plant Nutrition Department (Thaer-Institute of Agricultural and Horticultural Sciences, Life Science Faculty, Humboldt-Universität Berlin), and specifically to Julien Lemoine, who helped with irrigation during the hot Berlin summer (which was greatly appreciated).

I also wish to thank Soulayman Sakr and Joëlle Fustec for their inputs during the planning of this experiment.

Table des matières

Introduction (français)	1
Bibliographie	2
1. Contexte du projet	2
2. Toxicité des métaux lourds	2
Cuivre.....	2
Cadmium.....	4
3. Utilisation d'amendement afin de diminuer la mobilité des métaux lourds	5
Matériel & Méthodes	6
1. Paramètres initiaux	6
a. Sols.....	6
b. Amendement.....	7
c. Espèces végétales	7
<i>Silene vulgaris</i> :.....	8
<i>Trifolium pratense</i> :.....	8
d. Traitements considérés dans ce mémoire	9
2. Mise en place et entretien des pots.....	10
3. Traitement des échantillons	10
Résultats	10
1. Effets du traitement sur les caractéristiques du sol	10
2. Effets du traitement sur les plantes	11
Emergence des plantules	11
Développement des plantes	11
Evapotranspiration	11
Caractéristiques des plantes à la récolte	12
Morphologie des systèmes racinaires.....	12
Nodulation sur les racines de trèfle	13
Discussion	13
Conclusion	14

Contents

Introduction (English)	15
Literature review	16
1. Experiment context	16
2. Heavy metals toxicity	16
a. Copper	16
b. Cadmium.....	18
3. Use of amendment to reduce mobility of heavy metals	18
Materials and methods	21
1. Initial parameters	21
a. Soils	21
b. Amendments.....	22
c. Plant species.....	23
<i>Silene vulgaris</i> :	24
<i>Trifolium pratense</i> :.....	24
d. Experimental treatments considered in this thesis	26
2. Set-up and maintenance of the pot experiment.....	27
3. Harvest and sample processing.....	29
4. Statistics	30
Results	30
1. Treatment effects on soils characteristics :	30
2. Treatment effects on plants :.....	31
Plant emergence	31
Plant development.....	32
Evapotranspiration	34
Shoot and root biomass.....	36
Root morphology	39
Nodulation on <i>Trifolium</i> roots.....	41
Discussion	42
Conclusion	43
References	44

Appendix

Appendix I : Number of plants per pot.....	- 1 -
Appendix II : Maximal water holding capacity	- 2 -
Appendix III : <i>Shoot-root cadmium concentration</i>	- 3 -

Illustrations

Table 1 : Soil characteristics. Shown are concentrations of mobile (1 M NH ₄ NO ₃ -soluble) heavy metals, pH-values (in 0.0125M CaCl ₂), organic matter contents (determined by loss on ignition at 500°C) and water holding capacity (WHC) at a soil density of 1.2-1.3 Mg m ⁻³ . DM...Dry mass.	22
Table 2 : Maximal water holding capacity in uncontaminated soil and in contaminated soil with different rates of iron sludge addition. Water holding capacity was measured at soil densities of 1.2 to 1.3 Mg m ⁻³ in uncontaminated soil and in contaminated soil with 0 and 8% of iron sludge addition, and estimated for contaminated soils with 2 and 4% of iron sludge addition by linear interpolation between 0 and 8% (Appendix 2).....	28
Table 3 : Effect of iron sludge addition to contaminated soil on concentrations of mobile (0.01 M CaCl ₂ -soluble) heavy metals and pH values in bulk soil of pots without plants. Shown are means and standard deviations (n=3).....	31
Table 4 : Percentage of seedlings emerging from the pots during the first month of the experiment. All <i>Silene</i> pots contained 20 seeds, all <i>Trifolium</i> pots contained 15 seeds. Shown are means and standard deviations (n=4).....	32
Table 5 : Shoot and root dry mass of <i>Silene</i> and <i>Trifolium</i> at the end of the experiment after cultivation of the plants in uncontaminated soil and in contaminated soil at different levels of iron sludge (0,2,4,8%). Shown are means and standard deviations (n=4).....	37
<hr/>	
Figure 1 : Typical symptoms and consequences of Cu excess on plants. (Shabbir et al. 2020)	17
Figure 2 : Variation of plant coverage within a sewage field (H. Beßler).....	21
Figure 3 : Iron sludge before and after drying, crushing and sieving to particle sizes between 2 and 4 mm (upper row) and sewage field soil with iron sludge addition of 2, 4 and 8 % dry mass (lower row from left to right).....	23
Figure 4 : <i>Silene vulgaris</i> , genotype from a grower who sells local plants. (Rieger-Hofmann GmbH [sans date])	24
Figure 5 : <i>Trifolium pratense</i> , (Pflanzenbestimmung [sans date])	24
Figure 6 : Soil containing rhizobia compatible with <i>Trifolium pratense</i> was collected on 16-05-2023 in order to inoculate our plants. A : <i>Trifolium pratense</i> on the pre-established stand. B : Nodule present in the soil, cut open. C : Tools used to collect the soil.	26
Figure 7 : experiment plan, each cercle represent a pot / a repetition.	26
Figure 8: Measurement of the water holding capacity of the soils without and with 8% of iron sludge addition (front and back row, respectively) according to ISO 14238:2012 Appendix A: air dried soils	

were packed at a density of 1.2 to 1.3 Mg m⁻³ in glass cylinders with perforated base plates, transferred to a water bath until the soil columns were water saturated and, after drainage of the free soil water, weighted fresh and after drying at 105°C (26-04-2023). 28

Figure 9 : Pot experiment plant emergence. Treatments with plants were set up with four repetitions, which were arranged in four blocks. Treatments without plants were set up with three repetitions only, which were assigned to the first three blocks (09-06-20203)..... 28

Figure 10 : Sampling of rhizosphere soil from densely rooted regions of the soil column (left) ; cleaning of the root system from adhering soil (middle) ; cleaned root system (right) (12-07-2023)..... 29

Figure 11 : Pots of *Silene* and *Trifolium* in block A, 3 weeks after sowing (13-06-2023). 32

Figure 12 : Pots of *Silene vulgaris* from block C at the end of the experiment (10-07-2023)..... 33

Figure 13 : Pots of *Trifolium pratense* from block B at the end of the experiment (11-07-2023). 33

Figure 14: **A** : Necrotic symptoms on plants in pot n°47 (block A), *Trifolium pratense* in contaminated soil + 2% iron sludge. **B** : Plants without symptoms in pot n°9 (block B), *Trifolium pratense* in uncontaminated soil . Both pictures taken at the end of the experiment (11-07-2023)..... 34

Figure 15 : Cumulative evapotranspiration on pots planted with *Silene* over the course of the experiment. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%)..... 35

Figure 16 : Cumulative evapotranspiration on pots planted with *Trifolium* over the course of the experiment. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%)..... 35

Figure 17 : Cumulative evapotranspiration per pot over the course of the experiment in relationship to the total plant dry mass (shoot+root) per pot, harvested at the end of the experiment for *Silene* and *Trifolium*. Each point is a value-par of a single pot. Shown are data for all treatments with *Silene* and *Trifolium* (both N supply regimes)..... 36

Figure 18 : **Left** : Shoot dry mass per pot reported to the number of plant, after drying at 60°C. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%). **Right** : Root dry mass per pot reported to the number of plant t, after drying at 60°C. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%). 38

Figure 19 : Length of the longest taproot (in cm) of *Silene* and *Trifolium* plants. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%)..... 39

Figure 20 : Photographs of root systems of *Silene* and *Trifolium* plants. Photos are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%). (11-07-2023 / 14-07-2023) 40

Figure 21 : Photographs of root systems of *Trifolium* plants without (left, “fertilised”) and with (right, “inoculated”) rhizobia inoculation. Photos are presented for the contaminated soil not mixed or mixed with iron sludge (4%). Plants from Block A of the experiment (12-07-2023) 41

Figure 22 : Photograph of sliced nodules from *Trifolium* roots at the end of the experiment. 42

Introduction (français)

Berlin a longtemps utilisé des bassins de filtration afin de nettoyer les eaux usées de la ville. Ces champs d'épuration sont maintenant abandonnés et sont susceptibles d'être affectés, par exemple, de contamination aux métaux lourds (cuivre, nickel, cadmium, etc.) résultant de la filtration de ces eaux usées (LUA, 2003). Le Berliner Stadtgüter GmbH est une entreprise publique responsable de nombreux de ces anciens champs d'épuration. Elle contribue ainsi aux plans de développement locaux et participe à plusieurs projets de recherche appliquée. Ces projets étudient les utilisations potentielles de ces zones, par exemple dans la production d'énergie renouvelable ou encore pour des mesures de conservation de la nature (Berliner Stadtgüter, 2023).

De nombreuses années d'élimination des eaux usées sur ces zones ont conduit à une contamination généralisée du sol par des polluants organiques et divers métaux lourds. Ces derniers se dissolvent de plus en plus du fait de la minéralisation de la matière organique dérivée des boues d'épuration et de l'acidification du sol, ce qui endommage la végétation des zones. En conséquences, on constate la perte de biodiversité, la diminution de la qualité des plantes, de la productivité et finalement la réduction de couverture végétale. Cette évolution favorise le transfert des contaminants du sol vers les eaux souterraines et la chaîne alimentaire, et entrave la production de cultures de même que l'établissement de communautés végétales riches en espèces pour des mesures de conservation de la nature sur les terres (LUA, 2003 ; Beßler, communication personnelle).

Le Berliner Stadtgüter s'intéresse, entre autre, aux techniques de remédiation qui permettent de réduire le transfert des contaminants du sol vers l'environnement et d'établir la culture de prairies mellifères permanentes riches en espèces. Différentes techniques sont testées, avec pour objectif de fournir une protection à long terme (immobilisation) des métaux lourds dans les sols des champs d'épuration tout en restant économiquement viable (Berliner Stadtgüter, 2023 ; Beßler, communication personnelle). La combinaison d'immobilisation in situ et de phytostabilisation, dans laquelle le transfert des contaminants vers l'environnement est réduit par l'incorporation d'amendements (ayant des effets d'immobilisation des métaux lourds dans le sol) et par la culture de peuplements végétaux à forte productivité, constitue une technique prometteuse, offrant à la fois une couverture du sol toute l'année et un faible transfert de polluants vers les parties aériennes (Bolan et al., 2011).

Dans le cadre d'un projet conjoint entre le Département de Nutrition des Plantes de l'Université Humboldt de Berlin, le Département de Science des Sols de l'Université Technique de Berlin, le Berliner Stadtgüter GmbH et les autorités publiques chargées de la protection des sols et de la conservation de la nature, une telle technique de remédiation est actuellement recherchée. À cette fin, les effets de différents amendements du sol (en relation avec le ressemelement de prairies riches en espèces) sont étudiés sur d'anciens champs d'épuration près de Wansdorf. Les paramètres étudiés comprennent la mobilité des métaux lourds dans

le sol, ainsi que la diversité des espèces, la productivité et la teneur en contaminants des végétaux. Quatre amendements du sol sont utilisés dans ce contexte et ont montré de bons résultats en termes d'immobilisation des métaux lourds et de productivité dans des essais en parcelles de petite taille (chaux, boues de fer(hydr)oxyde, matériau carboné, poussière de roche). Les mesures sur le terrain sont complétées par des expériences en conditions contrôlées sur l'effet des amendements sur la vie du sol, les teneurs en humus et le transfert des métaux lourds.

Ce mémoire décrit l'une de ces expériences supplémentaires en conditions contrôlées, conçue pour identifier les taux d'application optimaux de boues de fer(hydr)oxyde pour l'immobilisation des métaux lourds et l'établissement de prairies riches en espèces sur des sols de champs d'épuration présentant différentes concentrations de métaux lourds mobiles.

Bibliographie

1. Contexte du projet

L'ancienne zone d'épuration de Wansdorf fait l'objet d'une enquête depuis quelque temps. Pendant plusieurs décennies, les eaux usées ont été déversées sur ces terrains pour être filtrées à travers le sol avant de retourner dans le canal. Ce n'était pas un problème significatif tant que l'eau ne contenait que des déchets domestiques. Cependant, l'ajout de polluants industriels a introduit des contaminants plus dangereux.

Divers polluants métalliques lourds peuvent être trouvés dans ces sols et leur répartition dans les différents champs d'égout est très hétérogène. Les principaux polluants dans la zone considérée dans l'étude sont le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le zinc (Zn) et le cadmium (Cd). La diminution de la densité de la végétation locale semble être directement liée à l'augmentation du cuivre (Cu) et du cadmium (Cd) mobiles (Beßler, communication personnelle). Par conséquent, ces deux métaux seront au cœur de cette étude.

2. Toxicité des métaux lourds

Cuivre

Le cuivre est naturellement présent dans tous les sols dans des taux compris entre 14 et 109 mg/kg (Kabata-Pendias et Pendias, 2011). La majorité de ce cuivre est en forme non soluble et donc non disponible pour les plantes (Mihaljevic et al., 2019). On estime que seulement un maximum de 20 % de la teneur totale en cuivre est phytodisponible. Cependant, différents facteurs peuvent influencer ce ratio, tels que le pH, les bio-exsudats ou la teneur en matière organique.

Sauve et al. (1997) ont rapporté que la forme dominante du cuivre avec un pH du sol < 9 est Cu^{2+} . L'augmentation du pH peut également augmenter le taux de complexation du cuivre (Rutkowska et al., 2013).

Certaines plantes ont également la capacité de solubiliser et de mobiliser le Cu dans le sol par l'excrétion d'exsudats racinaires, ce qui leur permet d'absorber des niveaux élevés de Cu (Lange et al., 2017).

Le Cuivre joue divers rôles biophysiques dans les plantes, notamment dans le métabolisme de la paroi cellulaire, la respiration mitochondriale, le transport électronique photosynthétique et la signalisation hormonale (Ameh and Sayes, 2019a ; Aguirre and Pilon, 2016).

Dans la plupart des cas, la concentration de cuivre (Cu) dans les feuilles des plantes se situe entre 5 à 20 mg/kg de poids sec (Yruela, 2009). Néanmoins, certaines espèces végétales ont la capacité d'absorber jusqu'à 1000 mg/kg de Cu dans leurs tissus foliaires. On qualifie ces espèces d'hyperaccumulatrices (Reeves et al., 2018).

Le cuivre étant une partie essentielle du métabolisme de la plante, plusieurs familles de transporteurs sont impliquées dans ses voies métaboliques, passifs mais également actifs (Grønberg et al., 2016).

Une concentration élevée de cuivre peut néanmoins devenir toxique pour les plantes. Les symptômes typiques observés sont la chlorose (pointes de feuilles chlorotiques ou nécrotiques), la nécrose, une forte inhibition de la croissance, une diminution de la photosynthèse, une diminution de la teneur en chlorophylle, une inhibition du photosystème (Shabbir et al., 2020). La toxicité du cuivre affecte principalement la croissance des racines, entraînant une ramification réduite, un assombrissement des racines et de manière générale un mauvais développement. Il peut également endommager l'épiderme et le cortex des racines (Marques et al., 2019).

Au niveau cellulaire, les principaux impacts de niveaux élevés de cuivre sont dus aux dommages oxydatifs dans l'apoplaste. L'exposition au cuivre peut entraîner une production accrue de molécules 'reactive oxygen species', provoquant un stress oxydatif. Dans des conditions normales, ces molécules ont des fonctions essentielles dans la défense et la signalisation des plantes (Neill et al., 2002 ; Pourrut et al., 2011), mais leur surproduction peut endommager les biomolécules et les organites cellulaires (Krayem et al., 2018 ; Sharma et al., 2019). Des mécanismes existent pour contrôler la production de ces molécules oxydatives, cependant, il existe un seuil de suraccumulation au-delà duquel la réaction n'est plus arrêtée par les antioxydants.

Le cuivre peut également se lier à des ligands de paroi cellulaire, réduisant ainsi la plasticité de la paroi, ainsi que la taille des pores apoplastiques, ce qui peut en perturber le flux (Kopittke et al., 2011b).

Des quantités excessives de cuivre peuvent également affecter négativement la teneur en pigments de la plante et ainsi perturber le processus de photosynthèse (Jaime-Perez et al., 2019 ; Bazihizina et al., 2015 ; Silva et al., 2018).

Cadmium

Dans le sol, la forme prédominante de ce métal est Cd^{2+} . Ses propriétés physico-chimiques conduisent à son accumulation dans la couche superficielle du sol en se liant à ses composants solides. Cette liaison est toutefois en grande partie réversible (Smolders et al., 1999), ce qui fait du cadmium l'un des métaux traces les plus facilement disponibles pour l'absorption par les racines après désorption dans la solution du sol (Lin et al., 2016).

Contrairement au cuivre, le cadmium ne remplit aucune fonction biologique reconnue chez aucun organisme, à l'exception de la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*, où il peut remplacer le zinc en tant que cofacteur pour l'anhydrase carbonique (Lane et al., 2005).

Le cadmium est au contraire considéré comme très préjudiciable à la majorité des organismes vivants, et sa toxicité résulte directement de sa capacité à rivaliser avec les métaux essentiels ainsi qu'avec le calcium. De manière similaire au cuivre, le cadmium peut également induire un stress oxydatif (Sterckeman, Thomine 2020).

Le cadmium peut pénétrer passivement dans les cellules racinaires en raison de leur potentiel électrique, ce qui cause son accumulation dans les systèmes racinaires de la plante. Une fois à l'intérieur du cytosol, les ions Cd peuvent toutefois former des complexes avec des ligands organiques, réduisant la concentration de Cd^{2+} libre dans le cytosol et atténuant ainsi sa toxicité. Chez certaines espèces, le cadmium peut ensuite être chargé dans les vaisseaux du xylème grâce à un système de transport actif (Sterckeman, Thomine 2020).

Certaines espèces utilisent ces mécanismes de transport afin d'accumuler le cadmium dans leur partie aérienne. Ces espèces font l'objet d'études plus détaillées en raison de leur potentiel en matière de détoxification du sol (Abe, Fukami, Ogasawara 2008).

Notre étude visait les espèces qui excluent le cadmium, c'est-à-dire les espèces qui bloquent l'entrée de Cd^{2+} dans le xylème. En effet, les zones sur lesquelles porte ce projet sont ouvertes au public, notre objectif est donc prioritairement de phytostabiliser les polluants dans le sol et non pas de les extraire.

3. Utilisation d'amendement afin de diminuer la mobilité des métaux lourds

Les amendements peuvent être des substances ou des matériaux, être ajoutés au sol pour améliorer ses propriétés physiques, chimiques ou biologiques. Certains amendements peuvent permettre d'immobiliser les métaux lourds dans le sol, atténuant ainsi le risque de lixiviation par les métaux lourds. C'est ce qui est recherché sur le site de Wansdorf.

Divers amendements du sol peuvent être utilisés pour immobiliser les métaux lourds en modifiant les propriétés du sol. Cela comprend la chaux ou encore les ajouts de matières organiques (Kumpiene et al., 2008 ; Park et al., 2011 ; Hua et al., 2017 ; Palansooriya et al., 2020).

Le choix de l'amendement et de la stratégie de remédiation doit être adapté aux conditions spécifiques du site et au type de métaux lourds présents. Les efforts de remédiation doivent également être menés avec précaution afin d'éviter des conséquences involontaires, telles que le lessivage des métaux lourds dans les eaux souterraines ou la perturbation des écosystèmes du sol.

Sur le site de Wansdorf, plusieurs amendements du sol ont été testés par le Département de Nutrition des Plantes de l'Université Humboldt. Parmi ces amendements, la boue de fer(hydr)oxide (appelée "boue rouge" dans la suite de ce mémoire) a montré les résultats les plus prometteurs (Beßler, communication personnelle). La boue rouge a la capacité de réduire la mobilité des métaux lourds dans le sol (Hua et al., 2017) et est disponible localement en grande quantité à faible coût. Par conséquent, elle devrait être testée dans une expérience modèle, comme dans la présente étude.

La boue rouge peut être générée lors du processus d'élimination du fer de l'eau potable ou des eaux souterraines.

Il existe 3 principales façons dont la boue rouge peut contribuer à réduire les concentrations de métaux lourds mobiles dans la solution du sol :

- Par le biais d'une augmentation du pH du sol. La boue rouge est alcaline et peut élever le pH du sol.
- Par adsorption. La boue rouge est poreuse et peut adsorber les métaux lourds sur sa grande surface.
- Par complexation. La boue rouge peut former des complexes avec les cations métalliques, les immobilisant ainsi dans le processus.

Il est important d'analyser les propriétés physiques et chimiques de la boue rouge avant de l'appliquer à grande échelle. Les caractéristiques physico-chimiques de celle-ci dépendent fortement de sa source. Selon ces propriétés, de nouveaux problèmes, indépendants de ces liés aux métaux lourds, peuvent survenir :

- Si la dose d'application n'est pas adaptée, l'alcalinité de la boue peut perturber l'environnement et être préjudiciable à la flore et à la faune naturelles déjà en place.
- La composition de la boue peut varier considérablement en fonction de sa source. Certaines boues de fer contiennent des sels solubles qui ont également le potentiel de perturber les populations naturelles.
- La boue rouge peut adsorber les cations métalliques mais elle peut aussi adsorber et immobiliser les nutriments nécessaires aux organismes vivants.
- Certaines boues contiennent déjà des métaux lourds, ce qui constitue un risque de contamination supplémentaire des sols.

Comment appliquer la boue rouge aux sols contaminés aux métaux lourds afin de faciliter l'établissement durable d'une végétation indigène, de promouvoir la biodiversité tout en minimisant les risques de dispersion des polluants par phytostabilisation?

Objectifs :

- Déterminer la quantité de boue rouge la plus appropriée à appliquer pour atteindre le taux de croissance optimal pour la silène et le trèfle.
- Étudier l'effet de la pollution sur la nodulation du trèfle.

Matériel & Méthodes

1. Paramètres initiaux

a. Sols

La contamination du sol varie considérablement au sein des champs d'épuration et est généralement la plus élevée à l'entrée des eaux usées et sur les anciennes zones de stockage des boues d'épuration. La concentration en métaux lourds mobiles (et donc potentiellement lessivables et disponibles) pour les plantes varie également considérablement, dépendant non seulement des concentrations totales en métaux lourds, mais aussi du pH du sol et de sa capacité d'échange de cations (LUA 2003 ; Shahid et al., 2011). La variation des concentrations de métaux lourds mobiles, en particulier du cuivre (Cu), entraîne d'importantes différences dans la couverture végétale, qui peut varier de 0 à 100 % dans un même champ (**Fig. 2**).

Dans le but de mener des expériences complémentaires sous serre, différents échantillons de sol ont été prélevés dans les champs de Wansdorf plus tôt dans l'année. Ces échantillons ont été classés en 3 catégories ont été déterminées : sol avec une couverture dense, sol avec une couverture clairsemée et sol nu.

Les trois sols diffèrent considérablement en termes de concentrations de cuivre (Cu) et de cadmium (Cd) mobiles (plus faibles sur les aires à dense couvert végétal) ainsi que de pH (plus élevé sur les aires à dense couvert végétal) (**Tab. 1**).

Les sols contaminés des champs sont des prairies, c'est pourquoi un sol non contaminé d'une autre prairie similaire a été utilisé comme témoin.

b. Amendement

La boue rouge a été utilisée comme amendement du sol car elle s'est révélée très efficace dans l'immobilisation des métaux lourds des sols contaminés. Elle est qui plus est disponible en grandes quantités à faible coût. Cependant, les taux d'ajout de boue rouge rapportés dans la littérature varient considérablement, de 0,5 à 30 % (Hua et al., 2017). Afin d'identifier le taux optimal de boue rouge à appliquer sur nos sols, ceux-ci ont été amendés avec 0, 2, 4 et 8% (de masse sèche). Cette boue était issue d'une station de traitement de l'eau voisine. Pour l'expérience, la boue a d'abord été séchée à l'air, puis broyée et tamisée pour obtenir des particules de taille comprise entre 2 et 4 mm (**Fig. 3**).

c. Espèces végétales

Pour réintroduire davantage de biodiversité dans les champs pollués, le choix des espèces végétales est essentiel. Par conséquent, une sélection de critères pour les espèces végétales a été effectuée.

- Les espèces végétales doivent être natives de la région. Cela en tant que mesure de conservation de la biodiversité naturelle.
- Les espèces doivent être des plantes herbacées à fleurs, ce type de végétation étant largement absent dans la région mais jouent un rôle important dans la biodiversité.
- Les espèces doivent être des plantes vivaces afin de couvrir le sol toute l'année. Cela est nécessaire pour l'immobilisation des métaux lourds.
- Les espèces doivent également être modérément tolérantes à la toxicité liée aux métaux lourds.
- Si possible, il serait également bon que les espèces puissent stabiliser les métaux dans leurs racines et les exclure de leurs parties aériennes, car les champs sont ouverts au public (enfants et animaux).

Deux espèces ont été choisies comme modèles pour cette expérience : *Silene vulgaris* et *Trifolium pratense*. Ce choix s'est appuyé sur leur tolérance aux métaux lourds, qui avait été testée précédemment dans le département (données non publiées).

***Silene vulgaris* :**

Silene vulgaris est une espèce végétale herbacée vivace appartenant à la famille des Caryophyllacées. Elle est originaire d'Europe mais a été introduite dans diverses régions du monde. *Silene vulgaris* présente une grande valeur écologique.

Silene vulgaris s'adapte bien aux sols bien drainés, de textures légères (sableuses) à modérées (limoneuses). Elle peut tolérer une gamme de pH allant de légèrement acide à neutre voire légèrement alcalin. Elle préfère une exposition au plein soleil et prospère dans des conditions de sol constamment humide.

Silene vulgaris fournit du nectar et du pollen à divers pollinisateurs, notamment les abeilles, les papillons de jour ou de nuit. Elle peut également servir de plante hôte pour les larves de certaines espèces de Lépidoptères, contribuant ainsi à leur cycle de vie.

***Trifolium pratense* :**

Trifolium pratense, communément appelé trèfle rouge, est une plante à fleurs herbacée appartenant à la famille des légumineuses (Fabacées) originaire d'Europe, d'Asie occidentale et d'Afrique du Nord.. Il est connu pour ses têtes de fleurs rouge à rose pourpre distinctives et ses feuilles trifoliées. Les fleurs sont attrayantes pour les pollinisateurs comme les abeilles et les papillons.

Trifolium pratense s'adapte bien aux sols à textures lourdes (argile) à modérées (limoneuses). Il peut tolérer une gamme de niveaux de pH allant de acide (<6.0) à neutre (6.0 - 8.0). Il apprécie un sol bien drainé, de préférence occasionnellement sec.

Le trèfle rouge est une source de nutrition de haute qualité pour les animaux de pâturage. Il joue également un rôle dans la fixation de l'azote grâce à sa relation symbiotique avec les bactéries fixatrices d'azote (rhizobium), ce qui peut améliorer la fertilité du sol.

Les rhizobiums sont un groupe de bactéries fixatrices d'azote capables d'établir une relation symbiotique avec les racines des plantes légumineuses telles que les pois, les haricots, le trèfle ou le soja. Cette association mutuellement bénéfique est cruciale pour le cycle de l'azote pour les écosystèmes.

Les rhizobiums ont la capacité unique de convertir l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniac (NH₃), une forme d'azote que les plantes peuvent facilement assimiler pour leur croissance. Ce processus, appelé fixation de l'azote, se produit dans des structures spécialisées appelées nodosités racinaires, qui se forment sur les racines des plantes légumineuses.

Les rhizobiums jouent un rôle crucial dans l'établissement d'écosystèmes durables. Les cultures légumineuses sont pratiquées dans le monde entier pour leur capacité à enrichir le sol en azote grâce à cette symbiose. Cela permet de réduire le besoin d'engrais azotés synthétiques, qui sont parfois responsables de pollutions environnementales.

Il ne pousse à l'heure actuelle pas de légumineuses dans les champs d'épuration pollués, il est donc très peu probable que des rhizobia soient présents dans nos échantillons de sol. L'inoculation à partir d'une source externe est alors nécessaire pour garantir la nodulation de *Trifolium pratense*.

Afin de s'assurer que l'inoculation serait réussie, des échantillons de sol ont été prélevés dans des zones où le trèfle rouge (**Fig. 6A**) était déjà installé. Après avoir vérifié que les racines présentaient des nodosités (**Fig. 6B**), des échantillons de sol et de racines ont été prélevés.

Le sol contenant des rhizobia a ensuite été broyé afin de conserver le matériau des nodosités mais de le faire passer à travers un tamis de 2 mm. Cela a permis de garantir que l'inoculum se mélangerait correctement avec le sol.

d. Traitements considérés dans ce mémoire

Bien que différents types de sols contaminés aient été utilisés dans les autres segments de cette expérience, ce mémoire ne fait référence qu'à un sol spécifique, il sera donc uniquement désigné comme sol contaminé dans les paragraphes suivants.

La croissance optimale des plantes sera évaluée en utilisant le sol non contaminé avec 4 répétitions.

Silene et *Trifolium* seront testés sur le sol contaminé avec des ajouts de boue rouge de 0%, 2%, 4% et 8%.

Le *Trifolium* inoculé avec rhizobium ne sera testé qu'à 0% et 4% d'ajout de boue rouge puisqu'il s'agira de la première étude sur les nodules dans ce projet. Cela afin de confirmer la viabilité de l'étude des rhizobiums dans les champs de Wansdorf avant d'y consacrer davantage de temps et de ressources.

2. Mise en place et entretien des pots

Les effets de l'ajout d'amendements et des espèces végétales sur les caractéristiques du sol et la croissance des plantes ont été testés dans une expérience en pot avec trois à quatre répétitions (pour les traitements avec et sans plantes, respectivement).

Les pots ont été mis en place le 17 mai 2023 et disposés selon un plan en blocs (**Fig. 9**). Après sept jours, des graines de *Silene* (20 graines) et de *Trifolium* (15 graines) ont été semées dans chaque pot. Après l'apparition des plantules, les plantes ont été éclaircies pour n'en garder en moyenne que cinq par pot. Ces plantes ont été cultivées dans une serre.

Le contenu en eau du sol a été maintenu en pesant quotidiennement les pots pour déterminer, ce afin de déterminer la perte d'eau par évapotranspiration et compenser ensuite cette perte d'eau par irrigation. Une surveillance quotidienne a été mise en place, cela comprenait une inspection visuelle des plantes pour enregistrer les symptômes de troubles nutritionnels et l'infestation des plantes par les ravageurs et les maladies.

3. Traitement des échantillons

Les plantes ont été récoltées bloc par bloc du 11 au 14 juillet (un bloc par jour). Les parties aériennes ont été récoltées en premier et leur masse fraîche a été mesurée immédiatement. Elles ont ensuite été placées dans des sacs en papier étiquetés et séchées au four à 65°C pendant deux jours. Pour l'échantillonnage des racines et du sol, l'ensemble du sol a été extrait des pots. Des échantillons de sol ont été prélevés dans les pots sans plantes ("sol brut") ainsi que dans les pots avec des plantes, dans des régions densément enracinées ("rhizosphère"), et, lorsque possible, dans des régions sans racines ("sol brut"). Les échantillons de sol ont ensuite été tamisés avec un tamis de 2 mm afin de retirer les fragments de racines et une majorité de boue rouge, puis séchés à l'air. Les systèmes racinaires ont été soigneusement nettoyés. La plus longue racine du pot a été mesurée avant que les racines ne soient placées dans des sacs en papier et séchées au four à 65°C pendant 2 jours également (**Fig. 10**).

Résultats

1. Effets du traitement sur les caractéristiques du sol

Des échantillons de sol ont été prélevés à la fin de l'expérience dans le sol densément enraciné (rhizosphère) et dans le sol sans racines (sol brut), afin d'évaluer les effets des amendements et des plantes sur les concentrations de métaux lourds mobiles et le pH du sol. Les analyses des échantillons de rhizosphère n'ont pas encore été achevées, seuls les résultats des échantillons de sol brut provenant des pots sans plantes peuvent être présentés (**Tab. 3**).

Ces données montrent que les concentrations de Cu, Cd, Ni et Zn mobiles dans le sol contaminé diminuent avec l'augmentation de l'ajout de boue rouge. La diminution des concentrations de métaux lourds mobiles est associée à une forte augmentation du pH du sol. Par conséquent, il existe une corrélation étroite entre le pH du sol et les concentrations de métaux lourds mobiles dans le sol contaminé.

2. Effets du traitement sur les plantes

Emergence des plantules

En moyenne, le taux d'émergence des plantes était plus faible dans le sol non contaminé (61%) que dans le sol contaminé, mais sans différence entre les espèces, les blocs, le niveau d'ajout de boue rouge ni le niveau de fertilisation au nitrate (*Trifolium* seulement ; **Tab. 4**). Le taux plus faible d'émergence des plantes dans le sol non contaminé est probablement dû à un compactage de la surface du sol en raison d'une irrigation intense lors de la première irrigation, ce qui a conduit à une fourniture sous-optimale en oxygène.

Développement des plantes

Les plantes dans le sol non contaminé n'ont montré aucun signe d'inhibition de la croissance ou de carence en nutriments au cours de l'expérience. En revanche, les jeunes plantes dans le sol contaminé sans ajout de boue rouge ont développé des feuilles plus petites. Les plantes dans le sol contaminé avec 8% de boue rouge ont également développé des feuilles encore plus petites, associé à un raccourcissement de la tige.

Les plantules poussant dans tous les mélanges de sol contaminé ont commencé à présenter des symptômes chlorotiques dès le début de l'expérience, comme le montre la **Figure 11**. Ces symptômes se sont atténués progressivement par la suite, mais étaient encore apparents lors de la récolte (**Fig. 12**). Ces symptômes étaient plus prononcés sur les feuilles plus anciennes.

Les silenes poussant dans le sol non contaminé ont commencé à fleurir 4 à 5 semaines après le semis, de même que celles poussant dans le sol contaminé avec ajouts de 2% et 4% de boue rouge. Ce n'était pas le cas des silenes poussant sur 8% de boue rouge. Certaines ont tout de même commencé à développer des bourgeons floraux la dernière semaine de l'expérience, 7 semaines après le semis, mais trop tard pour que les fleurs s'ouvrent avant la récolte.

Evapotranspiration

La perte d'eau par évapotranspiration des pots plantés avec *Silene vulgaris* au cours de l'expérience est présentée sur la **Figure 15**. Il y a une nette distinction entre les différents traitements. L'évapotranspiration est la plus élevée pour le sol non contaminé et la plus faible pour le sol contaminé sans ajout de boue rouge (0 %). Dans le sol contaminé, l'ajout de boue

rouge fer a augmenté l'évapotranspiration, mais l'effet était plus prononcé pour les ajouts de 2 % et 4 % que pour celui de 8 %.

La perte d'eau par évapotranspiration des pots plantés avec *Trifolium pratense* au cours de l'expérience est présentée sur la **Figure 16**. Comme chez les plantes de *Silene*, l'évapotranspiration était beaucoup plus élevée sur le sol non contaminé que sur le sol contaminé sans amendement. De plus, l'ajout de boue rouge a augmenté l'évapotranspiration, avec un effet plus prononcé à 2 % et 4 % d'ajout qu'à 8 %.

Caractéristiques des plantes à la récolte

Pour les deux espèces de plantes, les valeurs les plus élevées de biomasse aérienne ont été mesurées dans le sol non contaminé, et les valeurs les plus basses ont été mesurées dans le sol contaminé sans ajout de boue de fer (**Tab. 5**).

Les traitements avec 2 % et 4 % d'ajout ne différaient pas nettement l'un de l'autre, mais la biomasse aérienne était plus importante dans ces traitements par rapport au traitement avec 0 %, tout en restant moins importante par rapport au traitement avec le sol non contaminé. La biomasse aérienne de *Silene* et *Trifolium* pour le traitement avec 2 % représente respectivement 35 % et 66 % de la biomasse aérienne sur le sol non contaminé. La biomasse aérienne de *Silene* et *Trifolium* pour le traitement avec 4 % représente respectivement 44 % et 62 % de la biomasse aérienne sur le sol non contaminé.

La biomasse sèche de *Silene* et *Trifolium* pour le traitement avec 8 % est respectivement de 10 % et 32 % de la biomasse aérienne sur le sol non contaminé.

La biomasse aérienne de *Trifolium* cultivé sans fertilisation azotée est plus élevée que celle de *Trifolium* cultivé avec fertilisation azotée, sauf pour le sol contaminé sans ajout de boue rouge.

Chez les deux espèces de plantes, les valeurs les plus élevées de biomasse racinaire ont été mesurées dans le sol non contaminé, et les valeurs les plus basses ont été mesurées dans le sol contaminé. Les variations de biomasse racinaires sont similaires à celles des biomasses aériennes, dans des proportions différentes.

Morphologie des systèmes racinaires

Dans le sol non contaminé, la longueur maximale de la racine pivot est nettement plus courte chez *Trifolium* par rapport aux plantes de *Silene*, les racines de *Trifolium* ne dépassant pas la moitié de la profondeur de la colonne de sol (**Fig. 19**). Les plantes cultivées dans un sol contaminé sans ajout, présentent des racines pivot significativement plus courtes que dans un sol non contaminé (**Fig. 20**). De plus, les systèmes racinaires des deux espèces dans le sol contaminé sans ajout ne présentent que peu de ramification (**Fig. 20**), couvrant ainsi un volume de sol très limité. L'ajout de boue rouge augmente significativement la longueur

maximale des racines pivot, mais l'effet ne diffère pas significativement entre les trois niveaux d'ajout (2, 4, 8 %). L'ajout de boue de fer augmente de même la ramification du système racinaire dans les deux espèces (**Fig. 20**).

Nodulation sur les racines de trèfle

L'inspection visuelle des systèmes racinaires de *Trifolium pratense* sans inoculation à la récolte a montré que le sol prélevé sur le terrain n'induisait pas une nodulation adéquate lorsqu'il était fertilisé avec de l'azote, car seuls très peu de nodules pouvaient être observés.

Le sol non contaminé et les traitements avec 4 % d'ajout de boue rouge avaient de nombreux nodules dans les pots inoculés, notamment dans les 5 premiers centimètres du substrat (**Fig. 21**). Ce n'était cependant pas le cas pour les pots inoculés sans ajout de boue rouge au sol contaminé.

Les nodules de différentes plantes et pots ont été prélevés et coupés en deux. Tous les nodules observés étaient complètement blancs à l'intérieur, contrastant avec la couleur rose observée dans les nodules lors de la collecte de l'inoculum (**Fig. 6B**, p.15 ; **Fig. 22**).

Discussion

Cette étude confirme l'hypothèse selon laquelle la boue rouge serait une solution viable remédier au manque de biodiversité sur le site de Wansdorf, tout en immobilisant les métaux lourds.

La croissance des deux espèces modèles a été améliorée par l'ajout d'amendement, ce qui suggère que ces espèces pourraient être réintroduites avec succès dans les anciens champs d'épuration. Il est peu probable de réussir à créer une végétation aussi diversifiée et vigoureuse que les prairies naturelles, mais une amélioration de la biodiversité semble possible à grande échelle.

L'ajout de 2% et de 4% de résidu de fer a montré des efficacités similaires dans la croissance des plantes. Cependant, la production de biomasse a été légèrement inhibée dans les mélanges contenant 8% de boue rouge. Cela pourrait résulter de la toxicité indirectement induite par la boue rouge. D'autres analyses seront menées sur le matériel végétal sec afin d'identifier la cause directe de l'inhibition de la croissance. Les concentrations de macronutriments tels que le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le soufre (S) et le phosphore (P), ainsi que de micronutriments tels que le fer (Fe), le manganèse (Mn), le cuivre (Cu), le nickel (Ni) et le zinc (Zn) seront mesurées dans les parties aériennes récoltées.

Pour de futures applications sur le terrain, l'ajout de boue rouge devrait être étudié dans une fourchette de 2% à 4%. Il est cependant possible que les effets engendrés en plein champs

diffèrent par rapport aux pots, en effet certains facteurs externes tels que la pluie et le drainage pourraient influencer le comportement physico-chimique de l'amendement. De plus, la boue rouge utilisée dans cette expérience avait été préalablement tamisée (2mm-4mm) avant son incorporation au sol, ce qui n'est pas le cas pour une application en plein champs (la boue rouge a tendance à se dégrader en poudre, et comporte également des agrégats de 2mm à 5cm de diamètre). La taille des particules pourrait avoir un effet significatif sur l'adsorption des ions métalliques, ainsi que sur l'adsorption des nutriments.

La boue rouge est également un matériau très friable. Une étude à long terme de ses effets sur les composés mobiles du sol serait nécessaire pour évaluer sa fiabilité dans le temps.

Il est enfin crucial de noter que cette expérience visait uniquement à étudier l'effet direct de la toxicité des métaux lourds mobiles. Des facteurs tels que le stress hydrique ont été délibérément éliminés. La boue rouge est cependant capable de réduire l'évaporation de l'eau dans le sol (données non présentées). Étant donné que les métaux lourds ont tendance à ralentir la croissance des racines, on peut supposer qu'un effet indirect de la présence de métaux lourds serait une sensibilité accrue au stress hydrique. D'autres expériences sur cette hypothèse seront menées plus tard dans l'année. Les effets de la boue sur la phytodisponibilité de l'eau ne sont pas encore clairs, car si l'évaporation est réduite, on ne sait pas si l'eau restante est disponible pour l'absorption par les racines ou non.

L'étude de la nodulation du trèfle montre des résultats prometteurs. Une caractérisation plus poussée des nodules serait nécessaire afin d'évaluer les avantages potentiels pour la qualité des sols dans les zones polluées. Une étude sur la faisabilité de la réintroduction de ces bactéries dans les terrains pollués devrait également être menée avant d'inclure des légumineuses dans le mélange de semences à grande échelle.

Conclusion

Le principal objectif de l'étude était de déterminer la quantité de boue rouge à appliquer la plus appropriée pour obtenir un taux de croissance optimal chez la silène et le trèfle. D'après les résultats, ce taux idéal se situerait entre 2% et 4%. Cependant, cette hypothèse devrait être vérifiée d'abord sur le terrain, où les conditions diffèrent.

L'étude de l'effet de la pollution sur la nodulation du trèfle a quant à elle rendu des résultats mitigés. Le développement des nodules est possible dans le sol pollué par les métaux lourds avec l'ajout de boue rouge. Une évaluation plus approfondie des effets de ces nodules sur leur hôte symbiotique et sur leur environnement est toutefois nécessaire.

Introduction (English)

The land surrounding Berlin has been used for a long time as filtration basins for the city's wastewater. These so called sewage fields are now abandoned, and are expected to suffer for example, from heavy metal contamination (copper, nickel, cadmium, etc.) in the soil resulting from the filtration of this wastewater (Wessolek et al. 2018; LUA 2003).



The Berliner Stadtgüter GmbH are a publicly owned enterprise responsible for many of these former sewage fields. The Berliner Stadtgüter contribute to local development plans, and participate in several projects of applied research. These projects study the potential of future use of these areas, for example in renewable energy production or for nature conservation measures (Berliner Stadtgüter 2023).

Many years of wastewater disposal on the areas led to large-scale soil contamination with organic pollutants and various heavy metals. The latter are increasingly dissolved by the mineralisation of the sewage sludge derived soil organic matter and by soil acidification, leading to damage to the vegetation of the areas, manifested by loss of biodiversity, decrease in plant quality, productivity and eventually loss of plant cover. This development favours the transfer of contaminants from the soils into the groundwater and the food chain, and hampers crop production or establishment of species-rich plant communities for nature conservation measures on the land (LUA 2003; Beßler, personal communication).

Therefore, the land owners are interested in remediation techniques, which allow reduction of the contaminant transfer from soil into the environment and to use the areas for energy crop production or the cultivation of species-rich permanent grassland as bee pasture. The technique should provide long-term protection (immobilization) of the heavy metals in the sewage field soils and be economically feasible (Berliner Stadtgüter 2023; Beßler, personal communication). One promising remediation technique is a combination of in situ immobilization and phytostabilization, in which the transfer of contaminants to the environment is reduced by incorporation of amendments with heavy metal immobilizing effects into the soil and by cultivating plant stands with high productivity, year-round soil cover and low pollutant transfer to the shoots (Bolan et al. 2011).

In a joint project by the Department of Plant Nutrition of the Humboldt Universität zu Berlin, the Department of Soil Science of the Technische Universität Berlin, the Berliner Stadtgüter GmbH and public authorities for soil protection and nature conservation, such a remediation technique is to be developed and tested. For this purpose, the effects of different soil amendments in connection with the reseeded of species-rich grassland on the heavy metal mobility in the soil as well as the species diversity, productivity and contaminant content of the plant stands are investigated on former sewage fields near Wansdorf. Four soil amendments are used in this context that have shown good heavy metal immobilization and growth promotion in container trials (lime, iron(hydr)oxide sludge, carbon material, rock

dust). The measurements in the field are supplemented by experiments under controlled conditions on the effect of the soil amendments on soil life, humus contents and heavy metal transfer.

This thesis describes one of these supplemental experiments under controlled conditions, designed to identify optimal application rates of iron(hydr)oxide sludge for the heavy metal immobilization and the establishment of species-rich grasslands on sewage field soils with different concentrations of mobile heavy metals.

Literature review

1. Experiment context

The former sewage area at Wansdorf has been under investigation since some time. For decades, waste water was poured onto these lands to be filtered through the soil before returning to the canal. This was not a significant issue as long as the water only contained waste. However, industrial pollutants brought more dangerous contaminants.

Different heavy metals pollutants can be found in this soils and their distribution in the different sewage fields is very heterogenous (Beßler, personal communication). The main pollutants in the area considered in the study are copper (Cu), nickel (Ni), zinc (Zn) and cadmium (Cd). The local vegetation density decrease seems to be directly linked with increase in mobile Cu and Cd (Beßler, personal communication). The two metals will therefore be a focus of this study.

2. Heavy metals toxicity

a. Copper

Copper is present naturally in all soils and its background levels usually range between 14 and 109mg/kg (Kabata-Pendias 2000). The majority of this copper is insoluble and therefore not available for plants (Mihaljevič et al. 2019), it is assumed that only a maximum of 20% of the total copper content is phytoavailable. However, different factors can influence that ratio such as pH, bio exudates or organic matter content.

(Sauvé et al. 1997) reported that the dominant form of copper with a soil pH<9 is Cu²⁺. The increase in pH can also increase complexification rate of copper (Rutkowska, Szulc, Bomze 2013).

Some plants also have the ability to solubilize and mobilize Cu in soil via excretion of root exudates, leading them to be able of absorbing high levels of Cu (Lange et al. 2017).

Cu plays various biophysiological roles in plants, including iron mobilization, protein trafficking, cell-wall metabolism, mitochondrial respiration, photosynthetic electron transport, and hormone signaling (Ameh, Sayes 2019; Aguirre, Pilon 2016).

In most cases, copper (Cu) concentration in plant leaves falls within the range of 5 to 20 mg/kg of dry weight (Yruela 2009). Nevertheless, some plant species have the capacity to absorb as much as 1000 mg/kg of Cu within their leaf tissues, they are known as Cu hyperaccumulators (Reeves et al. 2018).

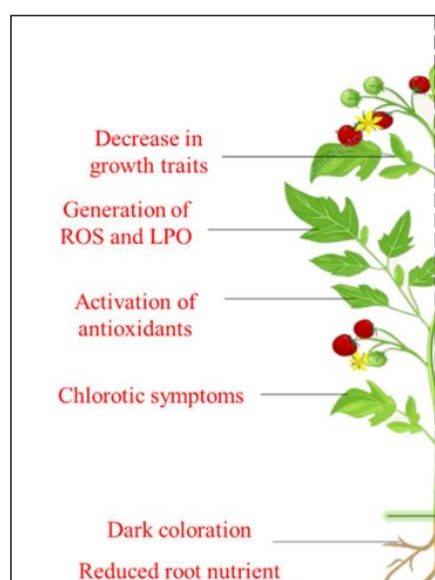


Figure 1: Typical symptoms and consequences of Cu excess on plants. (Shabbir et al. 2020)

With copper being an essential part of the plant metabolism, several families of transporters are involved in its metabolic pathways, including ATPase (Grønberg et al. 2016), and a cation transporters family named NRAMP (Nevo, Nelson 2006).

Nevertheless, high concentration of copper can become toxic to plants. Typical symptoms observed are chlorosis (chlorotic or necrotic leaf tips), necrosis, a strong growth inhibition, decreased photosynthesis, decreased chlorophyll content, inhibition to the photo-system (Shabbir et al. 2020). Copper toxicity primarily affects root growth, leading to reduced branching, darkening of roots, and poor development. It can also damage the root epidermis and cortex (Marques et al. 2019).

On a molecular level, the major impacts of high levels of copper are caused by oxidative damage in the apoplast. Exposure to toxic metals like Cu can lead to the increased production of reactive oxygen species, causing oxidative stress. Under normal conditions, these molecules have essential functions in plant defence and signalling (Neill et al. 2002; Pourrut et al. 2011), but their overproduction can damage biomolecules and cellular organelles (Krayem et al. 2018; Sharma et al. 2019). Mechanism exists to control the production of these oxidative molecules, however, there is a threshold above which the reaction is not stopped by antioxidants anymore.

Copper can also bind to cell wall ligands, thereby reducing the plasticity of the wall, as well as decreasing the apoplastic pore size, which might disturb the apoplastic flow (Kopittke et al. 2011).

In addition, excessive Copper amounts negatively affects plant pigment content and disrupts the photosynthesis process (Bazihizina et al. 2015; Jaime-Pérez et al. 2019).

b. Cadmium

In soil, Cd^{2+} is the predominant form of the metal. Its physicochemical properties lead to its accumulation in the plowed layer of soil by binding to solid soil components. However, this binding is largely reversible (Smolders et al. 1999), making Cd one of the most readily available trace metals for root absorption following desorption into the soil solution (Lin et al. 2016).

However, contrary to copper, cadmium serves no recognized biological function in any organism, except for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*, where it can replace zinc as a cofactor for carbonic anhydrase (Lane et al. 2005).

Cadmium is in fact highly detrimental to the majority of living organisms, and its toxicity is the direct result of its ability to compete with essential metals as well as calcium. In addition, and similarly to copper, cadmium can also induce oxidative stress (Sterckeman, Thomine 2020).

Cadmium can passively enter the root cells under typical electric potential, allowing for easy accumulation in the root systems of the plant. Once inside the cytosol, Cd ions form complexes with organic ligands, reducing the concentration of free Cd^{2+} in the cytosol and thereby mitigating its toxicity. In some species, cadmium can subsequently be loaded into the xylem vessels through an active transport system (Sterckeman, Thomine 2020).

Certain species use this loading mechanisms to accumulate cadmium in their shoot, this is largely thought of as a defence mechanism against herbivory. These species are studied in more detail due to their potential in soil detoxification (Abe, Fukami, Ogasawara 2008).

On the contrary of that approach (metal “includer” plants), the present study aimed for cadmium “excluders”, species that do not load Cd^{2+} in the xylem. As the site in Wansdorf is open to the public, the aim of the present study is to phytostabilise the pollutants in the soil, so that there is no risk of metal contamination from plants for the visitors.

3. Use of amendment to reduce mobility of heavy metals

Amendments are substances or materials that may be added to soil to improve its physical, chemical, or biological properties. In terms of reducing the mobility of heavy metals in soil, amendments can be employed to mitigate the risk of heavy metal contamination and make the soil safer for land use as intended on the Wansdorf site.

Various soil amendments can be used to immobilize heavy metals by altering soil properties (Kumpiene, Lagerkvist, Maurice 2008; Park et al. 2011; Hua, Heal, Friesl-Hanl 2017; Palansooriya et al. 2020) e.g.:

- Lime (Calcium Carbonate): Lime is commonly used to raise soil pH, which can reduce the solubility and mobility of certain heavy metals like lead, cadmium, and zinc. It also helps in precipitation of metals as less soluble forms.
- Organic Matter: Organic matter can improve soil structure and increase cation exchange capacity, which can help bind heavy metals and reduce their mobility.
- Phosphate Amendments: Adding phosphates to soil can lead to the formation of less soluble metal-phosphate complexes, reducing the bioavailability and mobility of heavy metals.
- Sulfur: Sulfur can lower soil pH, which can enhance the immobilization of heavy metals in certain soils.
- Clay Soil Additions: Clay minerals, like bentonite, can adsorb heavy metals, reducing their mobility. This method can be particularly effective for metals like copper and lead.
- Chelating Agents: Chelating agents, such as EDTA (ethylene diamine tetraacetate) or DTPA (diethylenetriaminepentaacetate), can be added to soil to form soluble metal-chelate complexes that are more easily extracted. While this can help with soil remediation, it may not be suitable for all situations due to the risk of mobilizing heavy metals into groundwater.
- Microbial Remediation: Certain microorganisms can transform or immobilize heavy metals through processes like bioreduction, biosorption, or bioaccumulation.
- Cover Crops: Planting specific crops as cover crops can help reduce the mobility of heavy metals by stabilizing the soil and taking up heavy metals from the soil.
- Phosphate Rock Amendments: Applying finely ground phosphate rock can gradually release phosphate ions, which react with heavy metals to form insoluble precipitates, reducing their mobility.
- Redox Manipulation: Altering the redox conditions in the soil (e.g., by adding organic matter or adjusting water saturation levels) can influence the speciation and mobility of heavy metals.

The choice of amendment and remediation strategy should be tailored to the specific site conditions and the type of heavy metals present. Remediation efforts should also be carried out with care to avoid unintended consequences, such as the leaching of heavy metals into groundwater or the disruption of soil ecosystems.

At the Wansdorf site, several soil amendments were tested by the Plant Nutrition Department of Humboldt University. From these amendments, iron(hydr)oxide sludge (termed “iron sludge” in the thesis) showed the most promising results (Beßler, personal communication). Iron sludge has the capacity to decrease heavy metal mobility in soil (Hua, Heal, Friesl-Hanl 2017), and is available locally in large amounts at low cost. It should therefore be tested in model experiment, as in the present study.

Iron sludge, also known as iron hydroxide sludge or ferric sludge, is a byproduct or waste material that forms during certain industrial processes involving the treatment of water or wastewater containing dissolved iron. It consists primarily of iron hydroxide ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) or iron oxide (Fe_2O_3) compounds, and it is a thick, reddish-brown or orange slurry with a high iron content (Hua, Heal, Friesl-Hanl 2017).

Iron sludge can be generated during the process of removing iron from drinking water or groundwater. When water contains elevated levels of iron, it is often subjected to aeration and/or chemical oxidation to convert the dissolved ferrous iron (Fe^{2+}) into ferric iron (Fe^{3+}), which forms insoluble iron hydroxide precipitates. These precipitates settle out of the water as sludge and can be removed from the treatment system.

There are 3 main ways in which the iron sludge can help reduce mobile heavy metal concentrations in the soil solution (Hua, Heal, Friesl-Hanl 2017) :

- via an increase in soil pH. Iron sludge is alkaline and can raise the pH of the soil.
- via adsorption. Iron sludge is porous and can adsorb heavy metal on its large surface area.
- via complexation. Iron sludge can form complexes with the metal cations, immobilising them in the process.

It is important to analyse the physical and chemical properties of the iron sludge before applying it on a large scale. Iron sludge characteristics are very dependent on their source. Depending on the iron sludge properties, several new problem could easily occur (Hua, Heal, Friesl-Hanl 2017) :

- If not dosed accurately, the alkalinity of the iron sludge could disrupt the environment and be detrimental to the natural flora and fauna already in place.
- Iron sludge composition can vary greatly depending on its source. Some iron sludges contain soluble salts which also have the potential to disrupt the natural populations.
- As iron sludge can adsorb metal cations, it can also adsorb and immobilise nutrients, making them less bioavailable. This can specifically be the case for calcium (Ca^{2+}), iron (Fe^{2+}), magnesium (Mg^{2+}) or phosphorus.
- Some iron sludges already contains heavy metals, this would be a risk to contaminate the soils even further.

The general aim of the present experiment was to contribute to the question of how to best apply red mud (iron sludge) to metal-contaminated soils in order to facilitate the sustainable establishment of native vegetation, promote biodiversity, and minimize the risks of pollutant dispersion through phytostabilization.

The specific objectives of the present study were to:

- Determine the most suitable amount of red mud (iron sludge) to apply in order to achieve the optimal growth rate for silene and clover plants.
- Study the effect of soil contamination and red mud (iron sludge) addition on clover nodulation.

Materials and methods

1. Initial parameters

a. Soils

Four soils were used in the experiment : a non-contaminated sandy loam (Standard soil 2.2, LUFA Speyer, Germany) and three sandy soils contaminated with different heavy metals. The contaminated soils were collected on former sewage fields north-west of Berlin (Wansdorf, 52° 37' 15.7" N, 13° 05' 08.2" E). The sewage fields cover an area of 106 ha and received up to 10 Mio. m³ of wastewater per year from 1912 to 1998. Wastewater was derived from regions with heavy industry and Cu foil production (Velten, Hennigsdorf) and therefore enriched in Cu and other heavy metals (Cr, Ni, Pb, Zn), which accumulated in the sewage field soils over time. Within single sewage fields, soil contamination varies considerably and is typically highest at the wastewater inlet and on former sewage sludge storing areas. The concentration of mobile and therefore potentially leachable and plant available heavy metals also varies considerably, depending not only on total heavy metal concentrations but also on soil pH and cation exchange capacity (LUA 2003; Shahid et al., 2011). The variation in concentrations of mobile heavy metals, particularly Cu, causes large differences in plant coverage, which can vary from 0 to 100 % in a single field (**Fig. 2**).



Figure 2 : Variation of plant coverage within a sewage field (H. Beßler)

To take this variation in account, soils were collected in an area with a dense coverage, an area with a sparse coverage and from a bareground. The three soils largely differed in concentrations of mobile (1 M NH₄NO₃-soluble; ISO 19730:2008) Cu and Cd, which were lowest in the densely covered soil and highest in the bareground, and in pH-values and organic matter contents, which were highest in the densely covered soil and lowest in the bareground (**Tab. 1**).

Table 1 : Soil characteristics. Shown are concentrations of mobile (1 M NH₄NO₃-soluble) heavy metals, pH-values (in 0.0125M CaCl₂), organic matter contents (determined by loss on ignition at 500°C) and water holding capacity (WHC) at a soil density of 1.2-1.3 Mg m⁻³. DM...Dry mass.

Parameters	Uncontaminated soil	Contaminated soil with dense plant coverage	Contaminated soil with sparse plant coverage	Contaminated soil without plant coverage
Cu (mg kg ⁻¹ DM)	<0.1	7.2	35.5	170.5
Cd (mg kg ⁻¹ DM)	<0.01	0.12	0.21	0.68
Ni (mg kg ⁻¹ DM)	0.02	0.87	0.40	0.70
Zn (mg kg ⁻¹ DM)	<0.1	10.5	16.6	13.6
pH	5.7	5.1	4.6	4.6
Organic matter (%)	3.2	4.5	4.1	3.6
WHC (mL kg ⁻¹ DM)	414	435	430	417

b. Amendments

Iron sludge was used as soil amendment because it has been shown to be a very efficient amendment for immobilization of heavy metals in metal contaminated soils and it is available in large amounts at low cost. However, iron sludge addition rates reported in the literature largely vary from 0,5 to 30 % (Hua, Heal, Friesl-Hanl 2017). To identify optimal iron sludge addition rates for the sewage field soils, the soils were amended with 0, 2, 4 and 8 % of iron sludge dry mass. The iron sludge was derived from a nearby water treatment plant, where iron is removed from water by precipitation and flocculation using lime (CaO) and an anionic Polyacrylamide (KOARET PA 3230 T, Kurita Europe GmbH, Ludwigshafen, Germany) and subsequent sedimentation and decantation. For the experiment, the iron sludge was air dried and then crushed and sieved to particle sizes between 2 and 4 mm (**Fig. 3**).



Figure 3 : Iron sludge before and after drying, crushing and sieving to particle sizes between 2 and 4 mm (upper row) and sewage field soil with iron sludge addition of 2, 4 and 8 % dry mass (lower row from left to right).

c. Plant species

In order to increase plant and insect diversity on the contaminated sewage fields the choice in plant species is key. Therefore, a selection of criteria for the plant species was made.

- Plant species need to be native from the area as a conservation of natural biodiversity measure.
- The species need to be herbaceous flowering plants, as such species are vastly absent in the area, but hold an important role in biodiversity.
- Species must be perennials in order to cover ground all year round. This is necessary for heavy metal immobilisation.
- Species must also be moderately tolerant to heavy metal related toxicity.
- If possible, it would also be a good addition if species could stabilise the metals in their root, and exclude it from their shoots, as the fields are open to the public (**Appendix III**).

Two species were chosen as models for this experiment : *silene vulgaris* and *trifolium pratense*. The choice was based on their tolerance to heavy metals, , and on their potential access to different nitrogen forms (Silene: mineral N from the soil; Trifolium: mineral N from the soil and N₂ from atmosphere).

Silene vulgaris :



Figure 4: *Silene vulgaris*, genotype from a grower who sells local plants. (Rieger-Hofmann GmbH [sans date])

Silene vulgaris is a herbaceous perennial plant species belonging to the Caryophyllaceae family. It is native to Europe but has been introduced to various regions around the world. *Silene vulgaris* is of great ecological value.

The stems of *Silene vulgaris* can reach heights of 20 to 60 cm. They are usually upright and bear clusters of white or pinkish flowers. The flowers are typically 2 to 2.5 cm in diameter. *Silene vulgaris* has a taproot system (*Silene vulgaris* - *Silène enflé* [sans date]).

Silene vulgaris is well adapted to well-draining soils, including light (sandy) and moderate (loamy) textures. It can tolerate a range of pH levels from slightly acidic to neutral and mildly alkaline. Requires full sun exposure and thrives in consistently moist soil conditions. (*Silene vulgaris* (Bladder Campion) [sans date])

Silene vulgaris is commonly found in a variety of habitats, including meadows, grasslands, woodland clearings, roadsides, and disturbed areas. It is often considered a weed in agricultural fields and gardens.

Silene vulgaris provides nectar and pollen for various pollinators, including bees, butterflies, and moths. It can act as a host plant for the larvae of some Lepidoptera species, contributing to their life cycle (Rieger-Hofmann GmbH [sans date]).

Trifolium pratense :



Figure 5: *Trifolium pratense*, (Pflanzenbestimmung [sans date])

Trifolium pratense, commonly known as red clover, is a herbaceous flowering plant that belongs to the legume family (Fabaceae). It is known for its distinctive red to pinkish-purple flower heads and trifoliate leaves (Pflanzenbestimmung [sans date]).

The stems of *Trifolium pratense* are typically upright and can grow to heights of 10 to 50 cm (eFlore [sans date]).

The flowers are attractive to pollinators like bees and butterflies. Red clover has a taproot system.

Trifolium pratense is well adapted to heavy (clay) to moderate (loamy) textures. It can tolerate a range of pH levels from acidic (<6.0) to neutral (6.0 – 8.0). *Trifolium pratense* enjoys a well drained soil and needs to be able to dry occasionally.

Trifolium pratense is native to Europe, Western Asia, and Northwest Africa but has been widely introduced and naturalized in many parts of North America and other regions. It can be found in various habitats, including meadows, pastures, roadsides, and disturbed areas. It often grows as a forage crop in agricultural fields and is used in pasture mixes for livestock (*eFlore* [sans date]).

Trifolium pratense is a valuable forage plant for livestock and is often grown as a fodder crop. It provides a source of high-quality nutrition for grazing animals. It also plays a role in nitrogen fixation due to its symbiotic relationship with nitrogen-fixing bacteria (rhizobia), which can improve soil fertility.

Rhizobia are a group of nitrogen-fixing bacteria that form a symbiotic relationship with the roots of leguminous plants, such as peas, beans, clover, and soybeans. This mutually beneficial association is crucial for nitrogen cycling in ecosystems.

Rhizobia have the unique ability to convert atmospheric nitrogen (N_2) into ammonia (NH_3), a form of nitrogen that plants can readily utilize for their growth. This process, known as nitrogen fixation, occurs within specialized structures called root nodules, which form on the roots of leguminous plants.

Rhizobia play a critical role in sustainable ecosystems. Leguminous crops are grown worldwide for their ability to enrich the soil with nitrogen through rhizobial symbiosis. This reduces the need for synthetic nitrogen fertilizers, which can have environmental impacts.

However, on the sewage fields, there are currently no legumes growing in the polluted fields, therefore the presence of rhizobia in our soil samples is very unlikely. Inoculation with an outside source is the necessary to ensure the nodulation of *Trifolium pratense*.

Different legume species often have specific strains or species of rhizobia that are most effective at forming symbiotic relationships with them (Marschner 2011).

In order to make sure the inoculation would be successful, soil samples were collected in established *Trifolium* stand (**Fig. 6A**). After making sure the roots displayed nodules (**Fig. 6B**), soil and root samples were taken.

The soil-roots mixture was milled before being passed through a 2mm sieve as a way to ensure that the inoculum would mix with the soil properly.



Figure 6 : Soil containing rhizobia compatible with *Trifolium pratense* was collected on 16-05-2023 in order to inoculate our plants. **A** : *Trifolium pratense* on the pre-established stand. **B** : Nodule present in the soil, cut open. **C** : Tools used to collect the soil.

d. Experimental treatments considered in this thesis

Species	Uncontaminated soil	Iron sludge addition to contaminated soil			
		0 %	2 %	4 %	8 %
No plant	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●
Silene	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
Trifolium (fertilised / +NO ₃)	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
Trifolium (inoculated / -NO ₃)	● ● ● ●	● ● ● ●	X	● ● ● ●	X

Figure 7 : experiment plan, each cercle represent a pot / a repetition.

Even though different types of contaminated soils were used in the other segments of this experiment, this paper only refers to 1 specific soil, therefore it will only be referred to as contaminated soil in the following paragraphs.

Optimal growth of the plants will be monitored using the uncontaminated soil with 4 repetitions.

Both *Silene* and *Trifolium* will be tested on contaminated soil with 0%, 2%, 4% and 8% iron sludge addition.

However, as this will be the first study on rhizobia in this project, the inoculated *Trifolium* will only be tested at 0% and 4%. This is to confirm the viability of studying rhizobia in the Wansdorf fields, before dedicating further time and resources.

2. Set-up and maintenance of the pot experiment

The effects of soils, amendment addition and plant species on soil characteristics and plant growth were tested in a pot experiment with three to four repetitions (for treatments without and with plants, respectively). For each repetition, 450 g (dry weight) of air dried soil was mixed with the respective amendment mass, fertilized with 150 mg P, 200 mg K and 84 mg S per kg of soil as KH_2PO_4 , K_2SO_4 , and MgSO_4 , filled in pots (17.5 cm height, 6 cm diameter) at a density of 1.1 to 1.2 g cm^{-3} , and moistened with 215 ml of aqua dest, which corresponds to 48 to 52% of the maximal water holding capacity of the substrate mixtures (for contaminated soil with 8% iron sludge addition and uncontaminated soil, respectively; **Tab. 2; Fig. 8**).

In addition, 100 mg N per kg of soil was fertilized as $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ to all treatments except for inoculated *Trifolium pratense*, which received 5 g of soil from an old *Trifolium* stand for inoculation (see 1c). Pots were set up on 17th of May 2023 and arranged in a block design (**Fig. 9**).

After seven days, seeds of *Silene* (20 seeds) and *Trifolium* (15 seeds) were sowed in each pot. After emergence and counting of the seedlings, plants were thinned to in average five plants per pot. Plants were cultivated in a glasshouse. The soil moisture content was maintained by daily weighing of the pots to determine water loss by evapotranspiration and subsequent compensation of the water loss by irrigation.

To avoid irrigation induced soil dispersion and surface sealing, a one cm thick layer of washed, coarse quartz sand (1-2 mm particle size) was added on top of the soil surface after plant emergence. The experiment was monitored at least once a day. This monitoring involved a visual inspection of the plants to record symptoms of nutritional disorders and plant infestation by pests and diseases.

Table 2 : Maximal water holding capacity in uncontaminated soil and in contaminated soil with different rates of iron sludge addition. Water holding capacity was measured at soil densities of 1.2 to 1.3 Mg m⁻³ in uncontaminated soil and in contaminated soil with 0 and 8% of iron sludge addition, and estimated for contaminated soils with 2 and 4% of iron sludge addition by linear interpolation between 0 and 8% (Appendix II).

Uncontaminated soil	Iron sludge addition to contaminated soil			
	0 %	2 %	4 %	8 %
414	435	(439)	(443)	450



Figure 8: Measurement of the water holding capacity of the soils without and with 8% of iron sludge addition (front and back row, respectively) according to ISO 14238:2012 Appendix A: air dried soils were packed at a density of 1.2 to 1.3 Mg m⁻³ in glass cylinders with perforated base plates, transferred to a water bath until the soil columns were water saturated and, after drainage of the free soil water, weighted fresh and after drying at 105°C (26-04-2023).



Figure 9 : Pot experiment plant emergence. Treatments with plants were set up with four repetitions, which were arranged in four blocks. Treatments without plants were set up with three repetitions only, which were assigned to the first three blocks (09-06-2023).

3. Harvest and sample processing

The plants were harvested block by block from 11th to 14th of July (one block per day). Shoots were harvested first and their fresh mass was measured immediately. They were then put in labelled paper bags and dried in the oven at 65°C for two days. For root and soil sampling, the entire soil was extracted from the pots. Soil samples were collected in pots without plants (“bulk soil”) and in pots with plants in densely rooted regions (“rhizosphere soil”) and, when possible, in regions without roots (“bulk soil”). Soil samples were then sieved with a 2 mm sieve in order to remove root fragments and most of the iron sludge particles, and air dried. The root system was carefully cleaned in water from adhering soil. The length of the longest root was measured with a ruler before roots were placed in paper bags and dried in the oven at 65°C for 2 days as well (**Fig. 10**).



Figure 10 : Sampling of rhizosphere soil from densely rooted regions of the soil column (left) ; cleaning of the root system from adhering soil (middle) ; cleaned root system (right) (12-07-2023).

In the soil samples, concentrations of mobile heavy metals in the soils were determined by soil extraction with 0.01 M CaCl₂ solution at a soil:solution ratio of 1:10 for 2 h (Houba et al. 1996) and subsequent measurement of the concentrations of Cd, Cu, Ni, Zn and P in the filtered (ashless, slow-flow filter 589/3, Hahnemühle, Germany) extracts with Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (iCAP 6300 Duo MFC, Thermo).

The pH-values of the soil samples were determined with pH meters in soil suspensions with 0.0125 M CaCl₂ solution at a soil:solution ratio of 1:2.5 after one hour of resting time (VDLUFA, 2016). Measurement of pH was limited to 30 soil samples per day and therefore lasted eight days. To account for day to day variation in the calibration of the pH meter, four reference soil samples with different pH-values (4.8, 5.6, 6.4, 7.0) were measured each day. From these measurements, regressions for the prediction of the reference pH-values from the daily pH-values were calculated and used to standardize the pH-values of the soil samples from the experiment. R² of the linear regressions were >0.99 and the average correction per sample was <0.01 pH unit.

4. Statistics

Means and standard deviations were calculated for each treatment. Effects of block, soils, level of iron sludge addition, plant species and nitrogen fertilisation (Trifolium only) were tested with analyses of variance (ANOVA) for significance. Differences between plant species (Silene, Trifolium) cultivated in nitrate fertilised soils and between Trifolium plants grown in soils with and without nitrogen fertilisation were tested in separate ANOVAs. In the thesis, F-ratios, degrees of freedom of factor and error terms and P-values are reported in the text. Pair-wise comparisons were conducted with Tukey tests and P-values are reported in the text. Variance homogeneity of the data was checked graphically by plotting the residuals and measured values. Data were transformed (sqrt) when spread of the residuals increased with measured values (hetero-scedasticity). Pearson correlation coefficient (r) is reported for selected pairs of metric parameters.

Results

1. Treatment effects on soils characteristics :

Soil samples were collected at the end of the experiment from densely rooted soil (rhizosphere soil) and from soil without roots (bulk soil), to assess effects of amendments and plants on the concentrations of mobile heavy metals and soil pH. However, the analyses of the rhizosphere soil samples have not yet been completed and therefore only results for the bulk soil samples from pots without plants can be presented (**Tab. 3**).

The data clearly show that the concentrations of mobile Cu, Cd, Ni and Zn in contaminated soil decrease with increasing addition of iron sludge ($F_{1,10}=26.72$, $P<0.001$ for Cd; $F_{1,10}=15.61$, $P=0.003$ for Cu; $F_{1,10}=24.09$, $P<0.001$ for Ni; $F_{1,10}=18.96$, $P=0.001$ for Zn). The decrease in concentrations of mobile heavy metals was associated with a strong increase in soil pH with increasing iron sludge addition ($F_{1,10}=26.61$, $P<0.001$). Consequently, there were close negative correlations between soil pH and concentrations of mobile heavy metals in the contaminated soil, when analysed over all levels of iron sludge addition ($r = -0.989$ for Cd, $r = -0.973$ for Cu, $r = -0.985$ for Ni, $r = -0.975$ for Zn).

Table 3 : Effect of iron sludge addition to contaminated soil on concentrations of mobile (0.01 M CaCl₂-soluble) heavy metals and pH values in bulk soil of pots without plants. Shown are means and standard deviations (n=3).

Parameter	Iron sludge addition to contaminated soil			
	0%	2%	4%	8%
Concentrations of mobile (0.01 M CaCl ₂ -soluble) heavy metals (mg kg ⁻¹ soil DM)				
Cu	7.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.6	1.3 ± 0.1
Cd	0.72 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Ni	2.30 ± 0.06	0.49 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.13 ± 0.01
Zn	17.5 ± 0.30	2.3 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.1
pH	5.14 ± 0.07	6.43 ± 0.08	6.73 ± 0.03	7.04 ± 0.05

2. Treatment effects on plants :

Plant emergence

On average, plant emergence rate was lower on uncontaminated soil (61%) than contaminated soil (78%; F_{1,27}=17.03, P<0.001) but did not differ between species (F_{1,27}=1.49, P=0.234), block (F_{3,27}=1.11, P=0.361), level of iron sludge addition to the contaminated soil (F_{1,27}=1.49, P=0.234) or level of nitrate fertilization (F_{1,20}=0.03, P=0.877; *Trifolium* only; **Table 4**). The lower rate of plant emergence in the uncontaminated soil was presumably due to soil surface sealing in the fine textured soil by intense irrigation during the set up of the experiment, leading to suboptimal oxygen supply.

Table 4 : Percentage of seedlings emerging from the pots during the first month of the experiment. All *Silene* pots contained 20 seeds, all *Trifolium* pots contained 15 seeds. Shown are means and standard deviations ($n=4$).

Species	Uncontaminated soil	Contaminated soil			
		0%	2%	4%	8%
<i>Silene</i>	60 ± 15	78 ± 8	79 ± 6	78 ± 17	64 ± 10
<i>Trifolium</i> (+NO ₃)	55 ± 16	87 ± 7	73 ± 8	88 ± 7	78 ± 9
<i>Trifolium</i> (-NO ₃)	68 ± 13	75 ± 21	-	82 ± 6	-

Plant development

Silene and *Trifolium* plants in the uncontaminated soil did not show any signs of growth inhibition or nutrient deficiency during the experiment. On the other hand, in the contaminated soil with no iron sludge addition young plants developed smaller leaves. Plants on the contaminated soil with 8% iron sludge addition also showed smaller leaves as well as shortened stems when compared to plants grown on uncontaminated soil. Plants grown on contaminated soil developed chlorotic leaves early on in the experiment (**Fig. 11**), irrespective of the level of iron sludge addition.

The symptoms observed on plants growing in contaminated soil (chlorotic and smaller leaves) subsided gradually with time but were still apparent at the end of the experiment.



Figure 11 : Pots of *Silene* and *Trifolium* in block A, 3 weeks after sowing (13-06-2023).

The *Silene* plants growing in the uncontaminated soil started flowering 4 to 5 weeks after sowing, as well as the one growing in the contaminated soil with 2% and 4% iron sludge mixtures. This was not the case for the *Silene* growing in the 8% iron sludge mixture. Some of which did start to develop flowering buds in the last week of the experiment, 7 weeks after sowing, but not in time to open the flowers before harvest (**Fig. 12**).

The plants in the contaminated soil without iron sludge started to wither and die a few weeks before harvest.

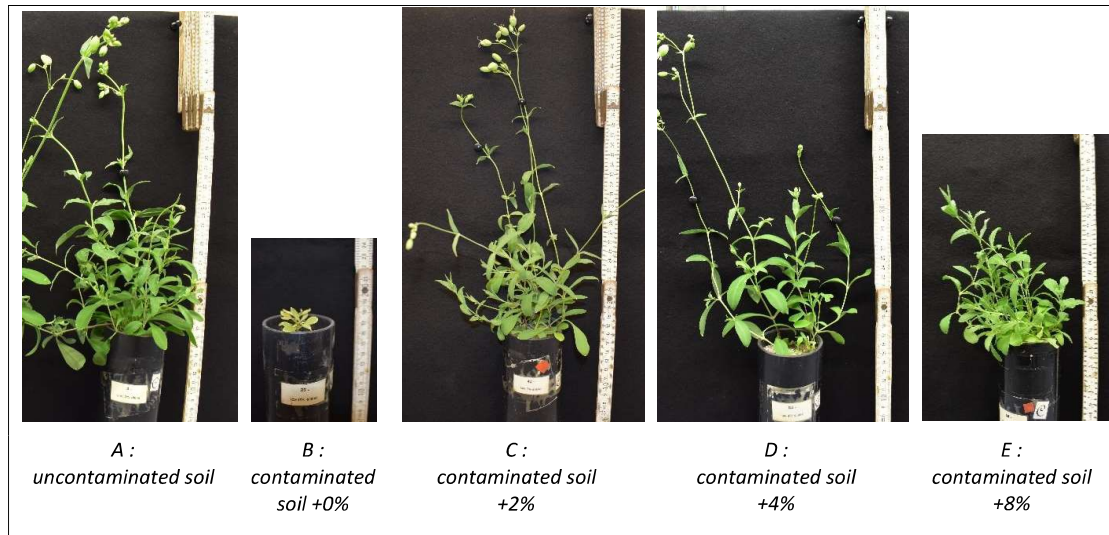


Figure 12 : Pots of *Silene vulgaris* from block C at the end of the experiment (10-07-2023).

As mentioned above, both *Silene* and *Trifolium* expressed chlorosis on their leaves when grown on contaminated soil, especially without iron sludge addition. The symptoms were stronger on older leaves. This was also clearly apparent at the end of the experiment (shown for *Trifolium* in **Figure 13**).



Figure 13 : Pots of *Trifolium pratense* from block B at the end of the experiment (11-07-2023).

Left to right : contaminated + 0% ; contaminated + 2% ; contaminated + 4% ; contaminated + 8%.

Some individual *Trifolium* plants growing on contaminated soil exhibited necrotic symptoms on the edge of the leaves. At the end of the experiment, all plants were exhibiting the same symptoms (**Fig. 14**).

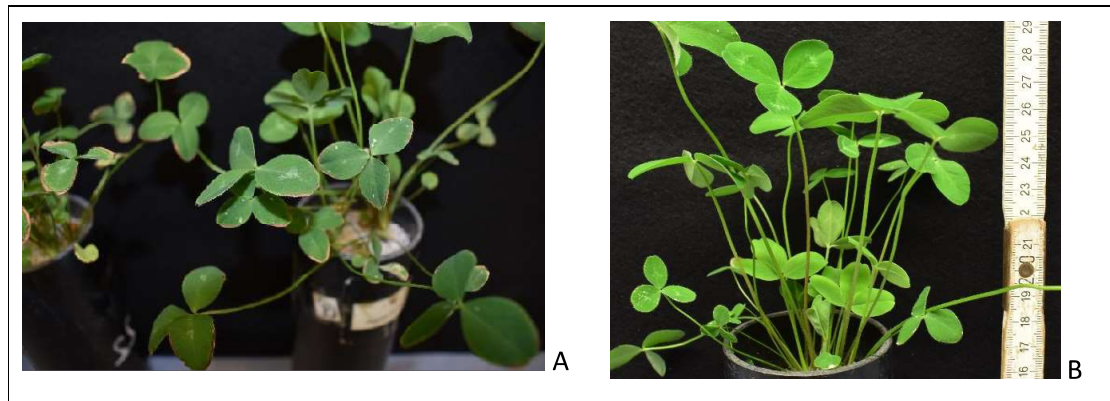


Figure 14: **A** : Necrotic symptoms on plants in pot n°47 (block A), *Trifolium pratense* in contaminated soil + 2% iron sludge. **B** : Plants without symptoms in pot n°9 (block B), *Trifolium pratense* in uncontaminated soil . Both pictures taken at the end of the experiment (11-07-2023).

Evapotranspiration

Water loss by evapotranspiration of the pots planted with *Silene vulgaris* over the course of the experiment is shown in **Figure 15**. There is a clear distinction between the different treatments. The evapotranspiration is the highest for the treatment with uncontaminated soil, and the lowest for the treatment with contaminated soil without iron sludge addition (0%). In the contaminated soil, iron sludge addition increased the evapotranspiration but the effect was stronger for the 2 and 4% than the 8% addition. However, maximal evapotranspiration achieved on the iron sludge amended contaminated soil was substantially lower than in the uncontaminated soil.

Water loss by evapotranspiration of the pots planted with *Trifolium pratense* over the course of the experiment is shown in **Figure 16**. As in *Silene* plants, evapotranspiration was much higher on uncontaminated than on the contaminated soil without amendment. Furthermore, iron sludge addition increased evapotranspiration but the effect was stronger at 2 and 4 than 8% addition. In contrast to *Silene*, evapotranspiration by *Trifolium* grown on contaminated soil with 2 and 4% iron sludge addition was as high as on uncontaminated soil (**Fig. 16**).

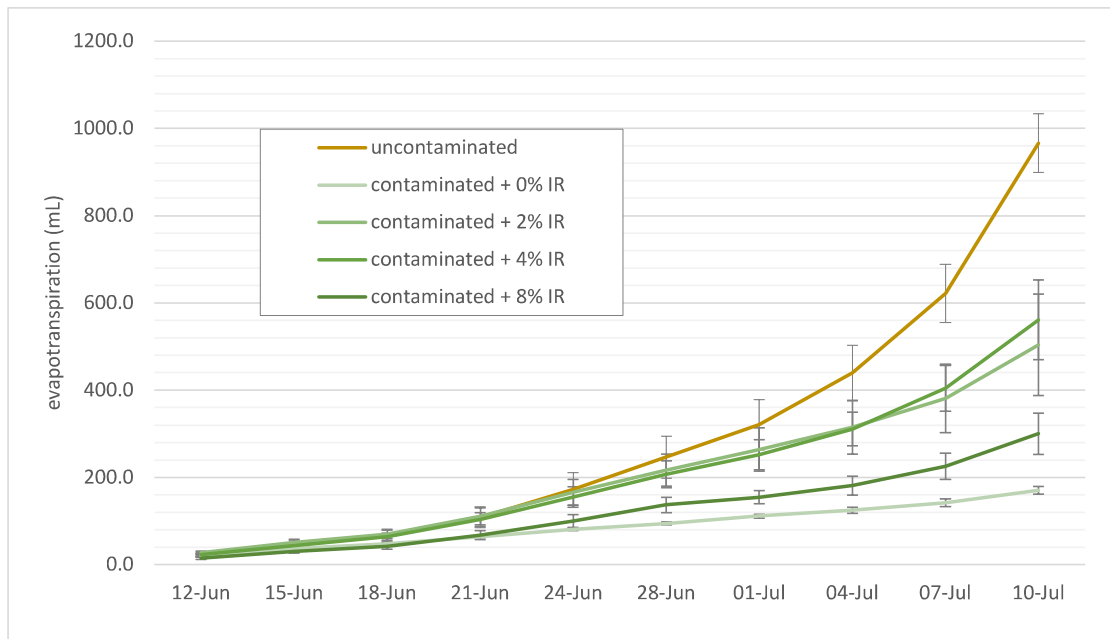


Figure 15 : Cumulative evapotranspiration on pots planted with *Silene* over the course of the experiment. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%).

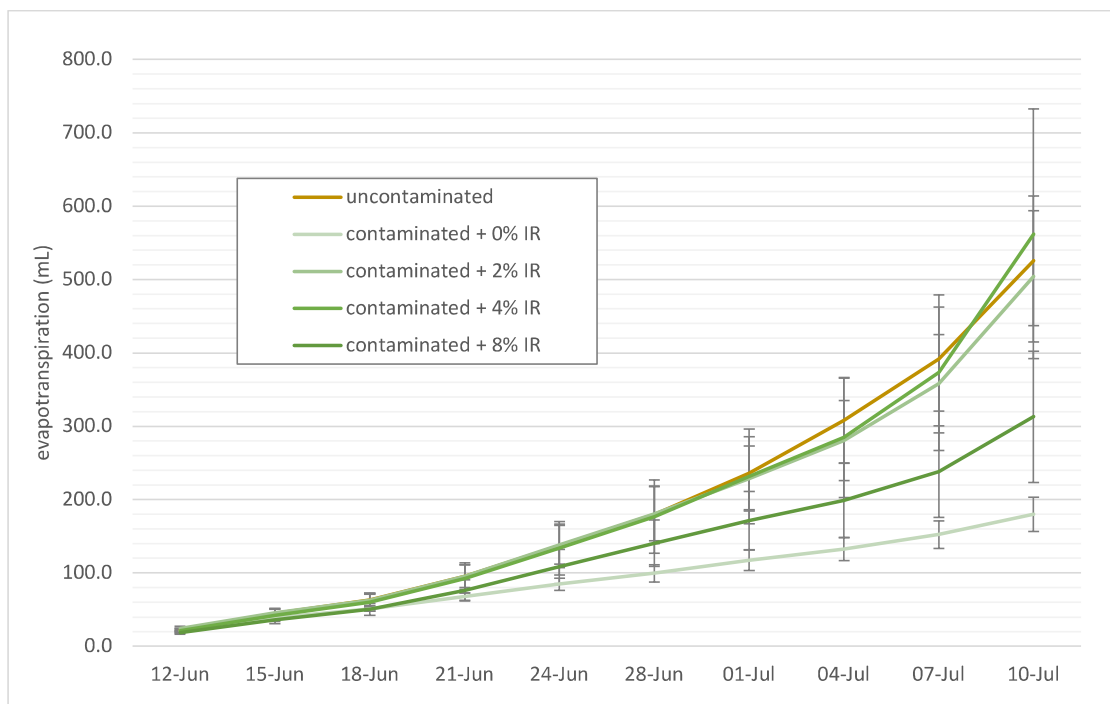


Figure 16 : Cumulative evapotranspiration on pots planted with *Trifolium* over the course of the experiment. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%).

The total amount of water that was evapotranspired per pot over the course of the experiment was related to the total plant dry mass harvested per pot at the end of the experiment (**Figure 17**). The close correlation ($r=0.972$ over both species) indicate that the variation in water loss was mainly due to variation in plant growth. The ratio of water loss per total plant dry mass was very similar in both species and soil treatments (about 390 L kg^{-1} of dry mass), except for the contaminated soil without iron sludge addition, where much higher ratios were recorded due to early senescence of the plants (about 2300 L kg^{-1} of dry mass).

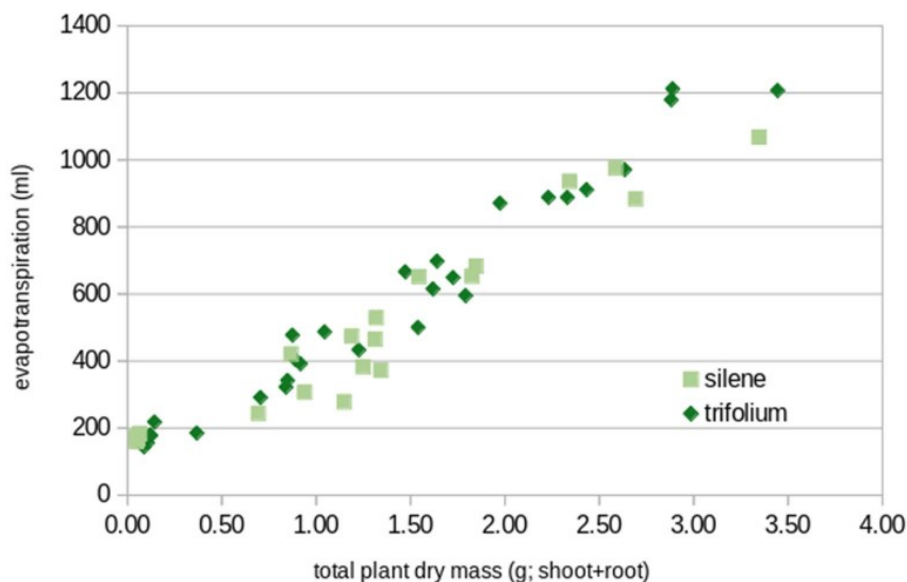


Figure 17 : Cumulative evapotranspiration per pot over the course of the experiment in relationship to the total plant dry mass (shoot+root) per pot, harvested at the end of the experiment for *Silene* and *Trifolium*. Each point is a value-par of a single pot. Shown are data for all treatments with *Silene* and *Trifolium* (both N supply regimes).

Shoot and root biomass

The shoot biomass was not affected by the block ($F_{3,27}=2.27$, $P=0.103$) but by the soil ($F_{1,27}=125.83$, $P<0.001$), the species, depending on the soil (Soil x Species: $F_{1,27}=22.41$, $P<0.001$), the iron sludge addition to the contaminated soil ($F_{3,27}=21.99$, $P<0.001$) and the nitrogen fertilisation (*Trifolium* only, $F_{1,20}=14.59$, $P=0.001$).

For both plant species, the highest values for shoot biomass were measured in the uncontaminated soil, and the lowest values were measured in contaminated soil without iron sludge addition (**Tab. 5 ; Fig. 18**).

The treatments with 2% and 4% iron sludge addition to contaminated soil were not clearly different from each other, but shoot biomass was larger in these treatments compared to the treatment with 0% iron sludge addition to contaminated soil, and it was less compared with the treatment with uncontaminated soil. *Silene* and *Trifolium* shoot biomass for the 2% iron

sludge addition treatment represented 35% and 66%, respectively, of the shoot biomass on uncontaminated soil. *Silene* and *Trifolium* shoot biomass for the 4% iron sludge addition treatment represented 44% and 62%, respectively, of the shoot biomass on uncontaminated soil.

Plants in treatments with 8% iron sludge addition had less shoot biomass compared with the treatments with 2% and 4% iron sludge addition while still having a higher shoot biomass than plants in the 0% iron sludge addition treatment. The shoot dry mass of *Silene* and *Trifolium* for the 8% iron sludge addition treatment were 10% and 32%, respectively, of the shoot biomass on uncontaminated soil.

When plants were growing on uncontaminated soil, *Silene* plants had approximately twice the shoot biomass compared with *Trifolium* plants (Tab. 5; Fig. 18). However, on contaminated soil at each level of iron sludge addition the shoot biomass of both plant species was not distinctly different from each other.

Shoot biomass of *Trifolium* cultivated without nitrogen fertilization was higher than in *Trifolium* cultivated with nitrogen fertilization, except for the contaminated soil without iron sludge addition.

Table 5 : Shoot and root dry mass of *Silene* and *Trifolium* at the end of the experiment after cultivation of the plants in uncontaminated soil and in contaminated soil at different levels of iron sludge (0,2,4,8%). Shown are means and standard deviations (n=4).

Species	Uncontaminated soil	Contaminated soil			
		0%	2%	4%	8%
a) Shoot dry mass (g)					
<i>Silene</i>	2.28 ± 0.32	0.04 ± 0.01	1.00 ± 0.29	1.10 ± 0.23	0.69 ± 0.21
<i>Trifolium</i> (+NO ₃)	1.18 ± 0.30	0.07 ± 0.03	0.86 ± 0.32	0.75 ± 0.43	0.49 ± 0.19
<i>Trifolium</i> (-NO ₃)	2.13 ± 0.29	0.07 ± 0.01	-	1.38 ± 0.14	-
b) Root dry mass (g)					
<i>Silene</i>	0.46 ± 0.16	0.01 ± 0.01	0.32 ± 0.12	0.37 ± 0.07	0.34 ± 0.14
<i>Trifolium</i> (+NO ₃)	0.29 ± 0.08	0.03 ± 0.01	0.27 ± 0.09	0.33 ± 0.16	0.30 ± 0.17
<i>Trifolium</i> (-NO ₃)	0.78 ± 0.18	0.03 ± 0.01	-	0.91 ± 0.20	-

The root biomass was not affected by the block ($F_{3,27}=0.67$, $P=0.579$) or species ($F_{1,27}=2.25$, $P=0.145$) but by the soil ($F_{1,27}=7.83$, $P=0.009$), the iron sludge addition to the contaminated soil ($F_{3,27}=13.35$, $P<0.001$) and the nitrogen fertilisation (*Trifolium* only, $F_{1,20}=23.47$, $P<0.001$).

For both plant species, the highest values for root biomass were measured in the uncontaminated soil, and the clearly lowest values were measured in contaminated soil without iron sludge addition.

The treatments with 2% and 4% iron sludge addition to contaminated soil were not clearly different from each other, but root biomass was larger in these treatments compared with the treatment with 0% iron sludge addition to contaminated soil, and it was less compared with the treatment with uncontaminated soil.

Plants in treatments with 8% iron sludge addition had less root biomass compared with the treatments with 2% and 4% iron sludge addition while still having a higher root biomass than plants in the 0% iron sludge addition treatment (Figure 19).

Root biomass of *Trifolium* cultivated without nitrogen fertilization was higher than in *Trifolium* cultivated with nitrogen fertilization, except for the contaminated soil without iron sludge addition.

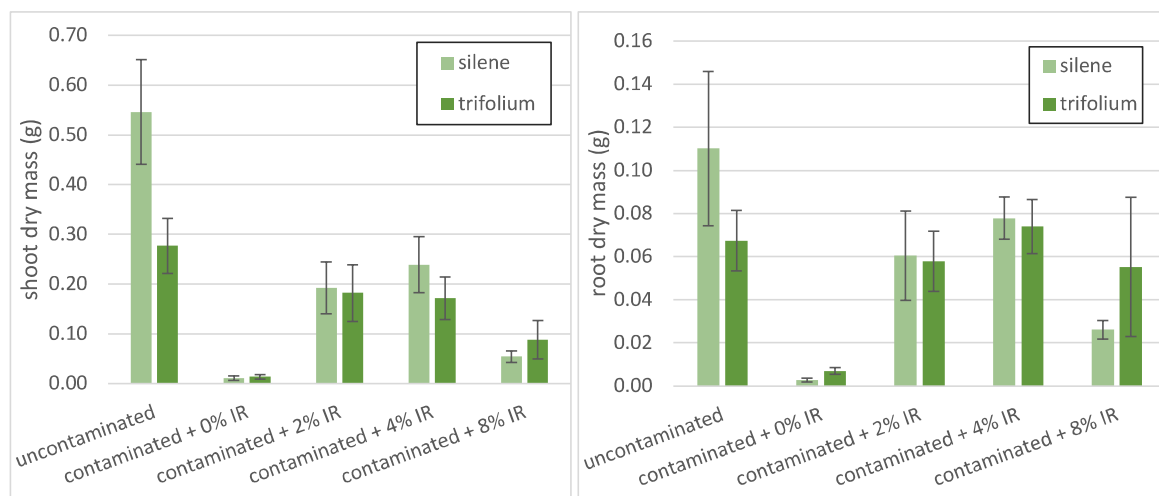


Figure 18 : **Left** : Shoot dry mass per pot reported to the number of plant, after drying at 60°C. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%). **Right** : Root dry mass per pot reported to the number of plant t, after drying at 60°C. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%). (See **Appendix I** for the number of plants per pot)

Root morphology

The length of the longest tap root for each pot was measured after harvest, and data are presented in Figure 20. The length of the longest tap root was not affected by the block ($F_{3,27}=0.28$, $P=0.843$) but by the species, depending on the soil (Soil x Species: $F_{1,27}=12.22$, $P=0.002$), the iron sludge addition to the contaminated soil ($F_{3,27}=9.50$, $P<0.001$) and the nitrogen fertilization (*Trifolium* only; $F_{1,20}=9.40$, $P=0.006$).

In uncontaminated soil, the maximal tap root length was distinctly lower in *Trifolium* compared to *Silene* plants, whereby *Trifolium* roots did not reach half of the soil column depth (**Fig. 19**). Plants grown in contaminated soil without any iron sludge addition showed significantly shorter tap roots than on uncontaminated soil. (**Fig. 20**). Furthermore, root systems of both species in contaminated soil without iron sludge addition showed little branching (**Fig. 20**), thus exploiting only a very small soil volume. Iron sludge addition increased the maximal length of the tap roots significantly, but the effect did not significantly differ among the three levels of iron sludge addition (2,4,8%). Iron sludge addition also increased branching of the root system in both species (**Fig. 20**).

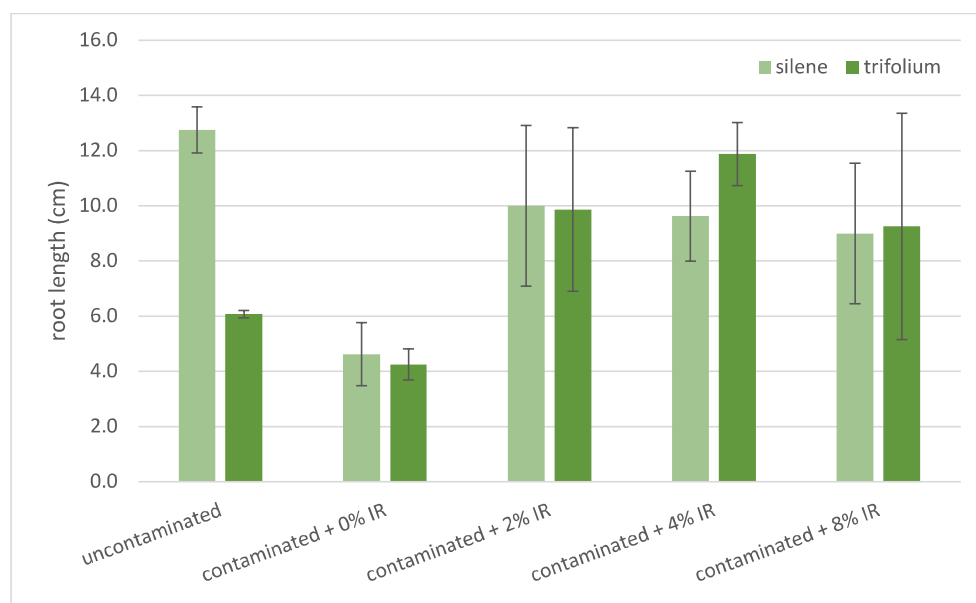


Figure 19 : Length of the longest taproot (in cm) of *Silene* and *Trifolium* plants. Results are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%).

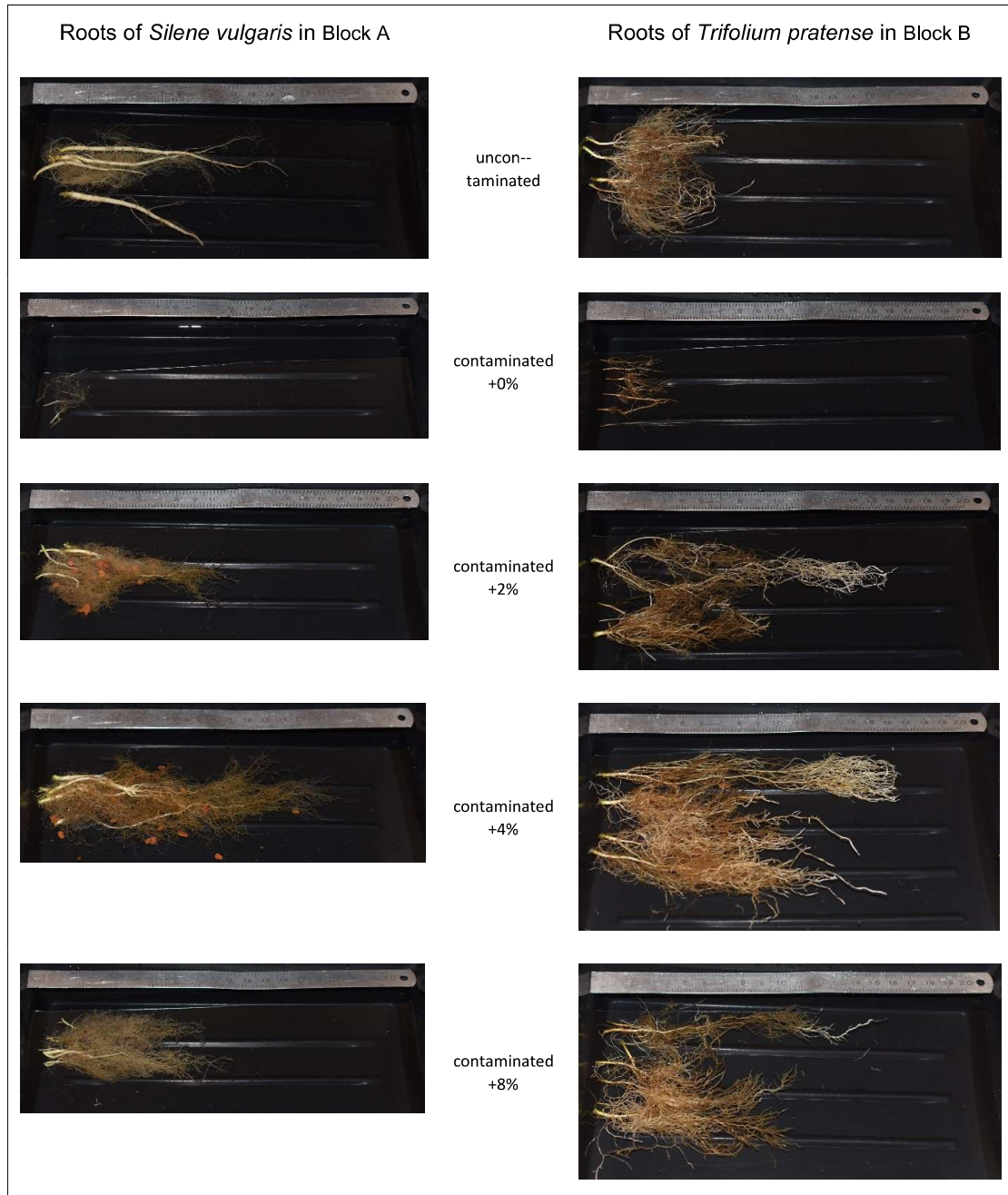


Figure 20 : Photographs of root systems of *Silene* and *Trifolium* plants. Photos are presented for the uncontaminated soil, as well as the contaminated soil mixed with different quantities of iron sludge (0%, 2%, 4% and 8%). (11-07-2023 / 14-07-2023)

Nodulation on *Trifolium* roots

To specifically study of the effects of soil contamination and iron sludge addition on nodulation of plant roots, extra pots of *Trifolium* were specifically inoculated with rhizobia (and not fertilised with nitrogen), and compared with *Trifolium* plants that had not been inoculated and fertilised with nitrogen. The visual inspection of root systems of *Trifolium pratense* without inoculation at the end of the experiment showed that the soil collected in the fields did not result in an adequate nodulation when fertilised with nitrogen, as only very few nodules could be seen.

In the pots that received rhizobia inoculation but no nitrogen fertiliser, few nodules could be observed in the contaminated soil without iron sludge addition. However, the uncontaminated soil and the 4% iron sludge addition treatments had a lot of nodules, especially in the upper 5 cm of the substrate (**Fig. 21**).

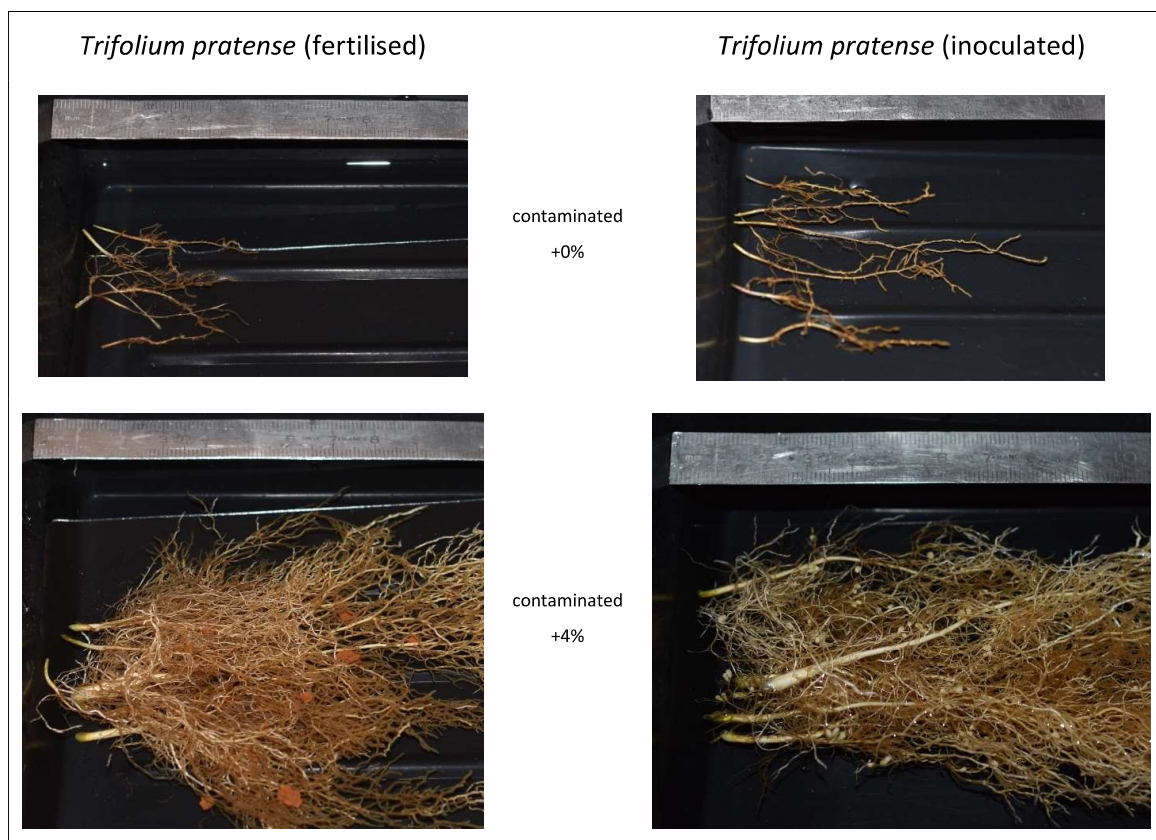


Figure 21 : Photographs of root systems of *Trifolium* plants without (left, “fertilised”) and with (right, “inoculated”) rhizobia inoculation. Photos are presented for the contaminated soil not mixed or mixed with iron sludge (4%). Plants from Block A of the experiment (12-07-2023)



Nodules from different plants and pots were sampled and cut in half. All nodules observed were completely white inside, which contrasts with the pink colour observed in the nodules during the collection of the inoculum (**Fig. 6B**, p.15 ; **Fig. 22**).

Figure 22 : Photograph of sliced nodules from Trifolium roots at the end of the experiment.

Discussion

This study corroborates the hypothesis that iron sludge is a good solution to immobilize heavy metals and facilitate the establishment of flowering plant stands on contaminated sewage field soils in Wansdorf.

Both model species' growth was enhanced by the amendment addition, suggesting that these species could be successfully reintroduce in the polluted sewage fields. It is unlikely to create a vegetation as diverse and vigorous as natural grasslands, but a biodiversity melioration seems possible on larger scale.

The addition of 2% and 4% of iron sludge showed similar efficiencies in plant growth. However, growth was slightly inhibited on the 8% iron sludge mixtures. This could be a symptom of indirect iron sludge induced toxicity. Further analysis are going to be conducted on the dry plant material in order to identify the direct cause of the growth inhibition. Concentrations of macronutrients such as potassium (K), calcium (Ca), Magnesium (Mg), sulfur (S) and potassium (P), as well as micronutrients such as iron (Fe), manganese (Mn), copper (Cu), nickel (Ni) and zinc (Zn) are going to be measured in the shoot biomass.

For future field applications, iron sludge addition should be studied in the range of 2% to 4%. It is unsure whether iron sludge addition will have the exact same effect in the fields compared to the pots considering external factors such as rain and drainage. In addition, iron sludge used in this experiment had been sieved (2mm-4mm) prior to its incorporation, which is not the case in the fields (where iron sludge presents as a powder mixed with large aggregates). The particle size could have significant effect on the metal ions adsorption, as well as nutrient adsorption.

Coincidentally, iron sludge is a very easily crumbled material. Long term study of iron sludge effects on soil mobile compound would be needed to assess its effectiveness over time.

It is crucial to note how this experiment only meant to study the direct effect of the mobile heavy metal toxicity. Factors such as drought stress were intentionally avoided. Iron sludge is however capable of reducing water evaporation in the soil (data not shown). Considering heavy metals tend to slow the root growth, it is possible to assume that an indirect effect of the heavy metal presence would be an increased sensitivity to drought stress. Further experiments on this hypothesis will be conducted later in the year.

Iron sludge effects on water phytoavailability are not yet clear as the evaporation is reduced but it is not known how much of this water is free for root uptake.

Study on *Trifolium* nodulation showed promising results. Further characterisation on the rhizobia would be needed to assess the potential benefits for the sewage fields. Study of the feasibility of large scale rhizobia reintroduction in the fields should also need to be conducted before including legumes in the sowing mix.

Conclusion

Our main objective in this study was to determine the most suitable amount of iron sludge amendment to apply in order to achieve the optimal growth rate for silene and clover. According to the results, the ideal rate of iron sludge addition would be between 2% and 4%. That estimation should however be verified in the fields first, as the conditions differ. On the other hand, study of the effect of pollution on clover nodulation showed mitigated results. Nodule development is possible in the heavy metal polluted soil with the addition of iron sludge. Further evaluation of the effects of this nodules on both their symbiotic host and their environment is needed.

References

ABE, Takuya, FUKAMI, Motohiro et OGASAWARA, Masaru, 2008. Cadmium accumulation in the shoots and roots of 93 weed species. *Soil Science & Plant Nutrition*. 2008. Vol. 54, n° 4, pp. 566-573. DOI 10.1111/j.1747-0765.2008.00288.x.

AGUIRRE, Guadalupe et PILON, Marinus, 2016. Copper Delivery to Chloroplast Proteins and its Regulation. *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 2016. Vol. 6. [Consulté le 20 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01250>

AMEH, Thelma et SAYES, Christie M., 2019. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 1 octobre 2019. Vol. 71, pp. 103220. DOI 10.1016/j.etap.2019.103220.

BAZIHIZINA, Nadia, COLZI, Ilaria, GIORNI, Elisabetta, MANCUSO, Stefano et GONNELLI, Cristina, 2015. Photosynthesizing on metal excess: Copper differently induced changes in various photosynthetic parameters in copper tolerant and sensitive *Silene paradoxa* L. populations. *Plant Science*. 1 mars 2015. Vol. 232, pp. 67-76. DOI 10.1016/j.plantsci.2014.12.015.

BOLAN, N. S., JINHEE, Park, ROBINSON, B., NAIDU, R. et KEUNYOUNG, Huh, 2011. Phytostabilization: a green approach to contaminant containment. *Advances in Agronomy*. 2011. Vol. 112, pp. 145-204.

GRØNBERG, Christina, SITSEL, Oleg, LINDAHL, Erik, GOURDON, Pontus et ANDERSSON, Magnus, 2016. Membrane Anchoring and Ion-Entry Dynamics in P-type ATPase Copper Transport. *Biophysical Journal*. 6 décembre 2016. Vol. 111, n° 11, pp. 2417-2429. DOI 10.1016/j.bpj.2016.10.020.

HOUBA, V. J. G., LEXMOND, Th. M., NOVOZAMSKY, I. et VAN DER LEE, J. J., 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Science of The Total Environment*. 19 janvier 1996. Vol. 178, n° 1, pp. 21-28. DOI 10.1016/0048-9697(95)04793-X.

HUA, Yumei, HEAL, Kate V. et FRIESL-HANL, Wolfgang, 2017. The use of red mud as an immobiliser for metal/metalloid-contaminated soil: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 5 mars 2017. Vol. 325, pp. 17-30. DOI 10.1016/j.jhazmat.2016.11.073.

JAIME-PÉREZ, Noelia, KAFTAN, David, BÍNA, David, BOKHARI, Syed Nadeem Hussain, SHREEDHAR, Sowmya et KÜPPER, Hendrik, 2019. Mechanisms of sublethal copper toxicity damage to the photosynthetic apparatus of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1 août 2019. Vol. 1860, n° 8, pp. 640-650. DOI 10.1016/j.bbabi.2019.06.004.

KABATA-PENDIAS, Alina, 2000. *Trace Elements in Soils and Plants*. 3. Boca Raton : CRC Press. ISBN 978-0-429-19112-1.

KOPITTKE, Peter M., BLAMEY, F. Pax C., MCKENNA, Brigid A., WANG, Peng et MENZIES, Neal W., 2011. Toxicity of metals to roots of cowpea in relation to their binding strength. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2011. Vol. 30, n° 8, pp. 1827-1833. DOI 10.1002/etc.557.

KRAYEM, Maha, DELUCHAT, Véronique, HOURDIN, Philippe, FONDANÈCHE, Patrice, LECAVELIER DES ETANGS, Florence, KAZPARD, Véronique, MOESCH, Christian et LABROUSSE, Pascal, 2018. Combined effect of copper and hydrodynamic conditions on *Myriophyllum alterniflorum* biomarkers. *Chemosphere*. 1 mai 2018. Vol. 199, pp. 427-434. DOI 10.1016/j.chemosphere.2018.02.050.

KUMPIENE, Jurate, LAGERKVIST, Anders et MAURICE, Christian, 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Management*. 1 janvier 2008. Vol. 28, n° 1, pp. 215-225. DOI 10.1016/j.wasman.2006.12.012.

LANE, Todd W., SAITO, Mak A., GEORGE, Graham N., PICKERING, Ingrid J., PRINCE, Roger C. et MOREL, François M. M., 2005. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*. 5 mai 2005. Vol. 435, n° 7038, pp. 42. DOI 10.1038/435042a.

LANGE, Bastien, VAN DER ENT, Antony, BAKER, Alan John Martin, ECHEVARRIA, Guillaume, MAHY, Grégory, MALAISSE, François, MEERTS, Pierre, POURRET, Olivier, VERBRUGGEN, Nathalie et FAUCON, Michel-Pierre, 2017. Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. *New Phytologist*. 2017. Vol. 213, n° 2, pp. 537-551. DOI 10.1111/nph.14175.

LIN, Zhongbing, SCHNEIDER, André, STERCKEMAN, Thibault et NGUYEN, Christophe, 2016. Ranking of mechanisms governing the phytoavailability of cadmium in agricultural soils using a mechanistic model. *Plant and Soil*. 1 février 2016. Vol. 399, n° 1, pp. 89-107. DOI 10.1007/s11104-015-2663-6.

LUA, 2003. Gefährdungsabschätzung und Sanierung von ehemaligen Rieselfeldern unter Berücksichtigung der Anforderungen von BBodSchG/BBodSchV: Bodenschutz und Altlastenbearbeitung 1. *Titelreihe Bodenschutz und Altlastenbearbeitung*. 2003. N° 77, pp. 121.

MARQUES, D. M., DA SILVA, A. B., MANTOVANI, J. R., MAGALHÃES, P. C. et DE SOUZA, T. C., 2019. Root morphology and leaf gas exchange in *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Caesalpinoideae) exposed to copper-induced toxicity. *South African Journal of Botany*. 1 mars 2019. Vol. 121, pp. 186-192. DOI 10.1016/j.sajb.2018.11.007.

MIHALJEVIČ, Martin, BAIETA, Rafael, ETTLER, Vojtěch, VANĚK, Aleš, KŘÍBEK, Bohdan, PENÍŽEK, Vít, DRAHOTA, Petr, TRUBAČ, Jakub, SRACEK, Ondra, CHRASTNÝ, Vladislav et MAPANI, Benjamin Siyowi, 2019. Tracing the metal dynamics in semi-arid soils near mine tailings using stable Cu and Pb isotopes. *Chemical Geology*. 20 juin 2019. Vol. 515, pp. 61-76. DOI 10.1016/j.chemgeo.2019.03.026.

NEILL, Steven J., DESIKAN, Radhika, CLARKE, Andrew, HURST, Roger D. et HANCOCK, John T., 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*. mai 2002. Vol. 53, n° 372, pp. 1237-1247.

NEVO, Yaniv et NELSON, Nathan, 2006. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1 juillet 2006. Vol. 1763, n° 7, pp. 609-620. DOI 10.1016/j.bbamcr.2006.05.007.

PALANSOORIYA, Kumuduni Niroshika, SHAHEEN, Sabry M., CHEN, Season S., TSANG, Daniel C. W., HASHIMOTO, Yohey, HOU, Deyi, BOLAN, Nanthi S., RINKLEBE, Jörg et OK, Yong Sik, 2020. Soil amendments for immobilization of potentially toxic elements in contaminated soils: A critical review. *Environment International*. 1 janvier 2020. Vol. 134, pp. 105046. DOI 10.1016/j.envint.2019.105046.

PARK, Jin Hee, LAMB, Dane, PANEERSELVAM, Periyasamy, CHOPPALA, Girish, BOLAN, Nanthi et CHUNG, Jae-Woo, 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. 30 janvier 2011. Vol. 185, n° 2, pp. 549-574. DOI 10.1016/j.jhazmat.2010.09.082.

POURRUT, Bertrand, SHAHID, Muhammad, DUMAT, Camille, WINTERTON, Peter et PINELLI, Eric, 2011. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. In : WHITACRE, David M. (éd.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213* [en ligne]. New York, NY : Springer. pp. 113-136. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. [Consulté le 22 septembre 2023]. ISBN 978-1-4419-9860-6. Disponible à l'adresse : https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4

REEVES, Roger D., BAKER, Alan J. M., JAFFRÉ, Tanguy, ERSKINE, Peter D., ECHEVARRIA, Guillaume et VAN DER ENT, Antony, 2018. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytologist*. 2018. Vol. 218, n° 2, pp. 407-411. DOI 10.1111/nph.14907.

RUTKOWSKA, B., SZULC, W. et BOMZE, K., 2013. Effects of soil properties on copper speciation in soil solution. *Journal of Elementology* [en ligne]. 2013. Vol. 18, n° 4. [Consulté le 20 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-1cbc07c2-1489-4959-8ddf-926da21161d6>

SAUVÉ, Sébastien, MCBRIDE, Murray B., NORVELL, Wendell A. et HENDERSHOT, William H., 1997. Copper Solubility and Speciation of In Situ Contaminated Soils: Effects of Copper Level, pH and Organic Matter. *Water, Air, and Soil Pollution*. 1 novembre 1997. Vol. 100, n° 1, pp. 133-149. DOI 10.1023/A:1018312109677.

SHABBIR, Zunaira, SARDAR, Aneeza, SHABBIR, Abrar, ABBAS, Ghulam, SHAMSHAD, Saliha, KHALID, Sana, NATASHA, MURTAZA, Ghulam, DUMAT, Camille et SHAHID, Muhammad, 2020. Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere*. 1 novembre 2020. Vol. 259, pp. 127436. DOI 10.1016/j.chemosphere.2020.127436.

SHARMA, Resham, BHARDWAJ, Renu, THUKRAL, Ashwani Kumar, AL-HUQAIL, Asma A., SIDDIQUI, Manzer H. et AHMAD, Parvaiz, 2019. Oxidative stress mitigation and initiation of antioxidant and osmoprotectant responses mediated by ascorbic acid in Brassica juncea L. subjected to copper (II) stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 30 octobre 2019. Vol. 182, pp. 109436. DOI 10.1016/j.ecoenv.2019.109436.

SMOLDERS, E., BRANS, K., FÖLDI, A. et MERCKX, R., 1999. Cadmium Fixation in Soils Measured by Isotopic Dilution. *Soil Science Society of America Journal*. 1999. Vol. 63, n° 1, pp. 78-85. DOI 10.2136/sssaj1999.03615995006300010013x.

STERCKEMAN, Thibault et THOMINE, Sébastien, 2020. Mechanisms of Cadmium Accumulation in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 3 juillet 2020. Vol. 39, n° 4, pp. 322-359. DOI 10.1080/07352689.2020.1792179.

WESSOLEK, Gerd, KLUGE, Björn, TRINKS, Steffen, FACKLAM, Michael et ZEUSCHNER, Olaf, 2018. From a stinking wastewater disposal field toward a recreation area—the story of an unconventional soil remediation in Berlin, Germany. *Journal of Soils and Sediments*. 1 février 2018. Vol. 18. DOI 10.1007/s11368-016-1609-9.

YRUELA, I., 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*. 2009. Vol. 36, n° 5, pp. 409-430.

Experimental methods and specifications :

ISO 14238:2012: Soil quality - Biological methods - Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes. 2012 (reviewed in 2023)

ISO 19730:2008. Soil quality - Extraction of trace elements from soil using ammonium nitrate solution. 2008 (reviewed in 2023)

VDLUFA (2016). Methode 5.1.1. Bestimmung des pH-Wertes. In VDLUFA (Ed.), Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch), Bd. I Die Untersuchung von Böden. VDLUFA-Verlag.

Websites :

Berliner Stadtgüter, 2023. [en ligne]. [Consulté le 22 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.berlinerstadtgueter.de/>

eFlore, [sans date]. *Tela Botanica* [en ligne]. [Consulté le 22 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.tela-botanica.org/eflore/>

Pflanzenbestimmung, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 22 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://pflanzenbestimmung.info/>

Rieger-Hofmann GmbH, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 17 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : https://www.rieger-hofmann.de/rieger-hofmann-shop/einzelarten/blumen.html?tt_products%5Bpp%5D=6&cHash=e4e1a7ed6801d95596f8430563a7397f

Silene vulgaris - Silène enflé, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 22 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.genialvegetal.net/-Silene-enfle->

Silene vulgaris (Bladder Champion), [sans date]. *Gardenia* [en ligne]. [Consulté le 22 septembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.gardenia.net/plant/silene-vulgaris>

Appendix

Appendix I : Number of plants per pot

Table 6 : number of plants per pot at harvest (11-07-2023).

Species		Uncontaminated soil	Iron sludge addition to contaminated soil			
			0%	2%	4%	8%
Silene	A	4	6	6	5	10
	B	5	3	5	4	11
	C	4	4	5	4	14
	D	4	4	6	6	16
Trifolium (+NO ₃)	A	4	5	4	6	5
	B	4	5	5	5	6
	C	5	4	5	4	5
	D	4	5	5	5	8
Trifolium (-NO ₃)	A	4	8	-	6	-
	B	4	4	-	4	-
	C	4	8	-	4	-
	D	4	8	-	4	-

Appendix II : Maximal water holding capacity

Table 2 : Maximal water holding capacity in uncontaminated soil and in contaminated soil with different rates of iron sludge addition. Water holding capacity was measured at soil densities of 1.2 to 1.3 Mg m⁻³ in uncontaminated soil and in contaminated soil with 0 and 8% of iron sludge addition, and estimated for contaminated soils with 2 and 4% of iron sludge addition by linear interpolation between 0 and 8%.

Uncontaminated soil	Iron sludge addition to contaminated soil			
	0 %	2 %	4 %	8 %
414	435	(439)	(443)	450

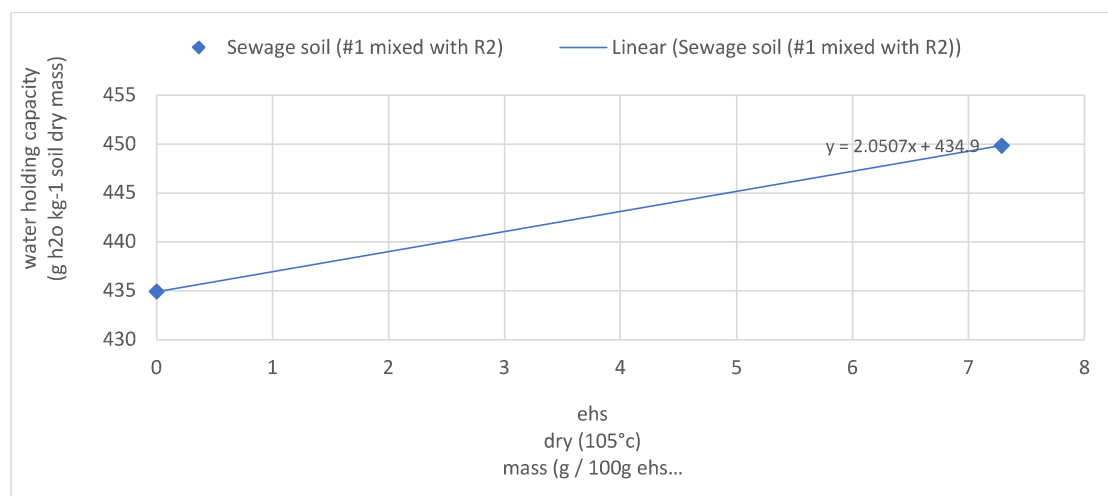


Figure 23 : linear interpolation between water holding capacity in contaminated soil with 0% and 8% iron sludge addition.

Appendix III : Shoot-root cadmium concentration (Abe, Fukami, Ogasawara 2008)

Cadmium concentrations in the shoots and roots, the shoot–root ratio of Cd and the shoot Cd content of 101 plant species grown in a sandy loam soil containing 3 mg Cd kg⁻¹ dry weight for 2 months.

Here are displayed only biennials and perennials from the 101 species considered in this article.

Plant species	Family	Cd concentration (mg kg ⁻¹ DW)		Shoot–root ratio	Shoot Cd content (µg plant ⁻¹)	Characteristics :	native :	Compatibility with the project :
		Shoot	Root					
<i>Plantago virginica</i>	Plantaginaceae	1.4	73.1	0.02	0.9	perennial	asian	no
<i>Oenothera biennis</i>	Onagraceae	1.8	171.9	0.01	3.7	biennial	north america	no
<i>Trifolium repense</i>	Leguminosae	2.7	23.9	0.11	0.2	perennial	european	yes
<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	3.2	46	0.07	2.6	perennial	european	yes
<i>Phytolacca americana</i>	Phytolaccaceae	4.4	82.6	0.05	3.8	perennial	USA	no
<i>Siene dioica</i>	Caryophyllaceae	4.9	113	0.04	2.1	perennial	european	yes
<i>Plantago lanceolata</i>	Plantaginaceae	5.5	62.2	0.09	1.5	perennial	european	yes
<i>Calystegia sepium</i> var. <i>americana</i>	Convulvaceae	5.7	122.6	0.05	2.9	climbing perennial	american	no
<i>Diplobatis tenuifolia</i>	Cruciferae	7.3	43.2	0.17	3.8	perennial	european	yes
<i>Trifolium arvense</i>	Leguminosae	8	56.8	0.14	0.4	annual or biennial	european	yes
<i>Siene armeria</i>	Caryophyllaceae	8.7	57.4	0.15	2.5	perennial	european	yes
<i>Rumex conglomeratus</i>	Polygonaceae	9.5	29.3	0.32	3.5	annual or biennial	european	yes
<i>Salvia plebeia</i>	Labiatae	9.7	116.6	0.08	5.4	annual or biennial	asian	no
<i>Euphorbia esula</i>	Euphorbiaceae	12.5	46.3	0.27	1	perennial	european	yes
<i>Avenaria serpyllifolia</i>	Caryophyllaceae	15.5	71.7	0.22	2.9	annual or biennial	european	yes
<i>Hypochaeris radicata</i>	Compositae	16.5	16.3	1.01	6.2	perennial	european	yes
<i>Rumex obtusifolius</i>	Polygonaceae	23.6	20.9	1.13	3.9	perennial	european	yes
<i>Lactuca indica</i>	Compositae	25.9	11.4	2.2	11.6	biennial	asian	no
<i>Onopordum acanthium</i>	Compositae	30	37.7	0.8	10	biennial, invasive	european	?
<i>Malva sylvestris</i>	Malvaceae	33.5	37.9	0.89	12.7	biennial	european	yes
<i>Sonchus asper</i>	Compositae	37	20.7	1.79	14	annual or biennial	european	yes
<i>Cichorium intybus</i>	Compositae	77	21.6	3.56	38.8	perennial	european	yes

	Diplôme : ingénieur agronome ESA Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : I2PH Enseignant référent : M. Soulaïman Sakr	
Auteur(s) : Enora Ars Date de naissance* : 02/06/1998	Organisme d'accueil : Humboldt Universität zu Berlin, plant nutrition department Adresse : Albrecht-Thaer-wed, 4 14195 Berlin, Germany	
Nb pages : Annexe(s) :	Maître de stage : Herr Holger Beßler	
Année de soutenance : 2023		
Titre français : Application de boue rouge sur des sols pollués aux métaux lourds à Berlin : Favoriser la biodiversité par l'installation durable d'une végétations d'origine locale, tout en limitant les risques de diffusion des polluants grâce à la phytostabilisation. Titre anglais : Application of red mud (iron sludge) on heavy metal polluted soils in Berlin : Promote biodiversity through the establishment of a native and sustainable vegetation, while limiting the risk of pollutant dispersion via phytostabilisation.		
Résumé Cette expérience s'inclue dans un projet visant à rétablir une végétation pérenne dans d'anciens terrains d'épuration pollués. La boue rouge a été testée en tant qu'amendement pour réduire la mobilité des métaux lourds dans le sol. Deux espèces modèles ont été choisies pour tester son effet : <i>Silene vulgaris</i> et <i>Trifolium pratense</i> . L'incorporation de l'amendement a été testée à trois taux différents : 2 %, 4 % et 8 % (par rapport à la masse sèche totale du sol) afin d'identifier le meilleur taux d'application. L'expérience a été menée en serre sur une période d'environ 6 semaines. Tout le matériel végétal (aérien et racines) a été récolté, des échantillons de sol ont également été prélevés en rhizosphère ainsi que dans des pots sans plantes. Les quantités d'évapotranspiration ont été relevées quotidiennement. Les parties végétales ont été séchées à 60°C puis pesées. Les systèmes racinaires ont été mesurés. Le pH et les concentrations en métaux lourds mobiles ont été mesurées dans les échantillons de sol. Les résultats ont montré une augmentation prometteuse de la croissance pour les deux espèces modèles, avec un meilleur taux d'application compris entre 2 % et 4 % de boue de fer. Une étude supplémentaire a été réalisée sur le comportement des rhizobiums de <i>Trifolium pratense</i> en présence de métaux lourds. Les observations ont montré que la nodulation peut se faire en présence de boue rouge, mais des données sur la caractérisation des rhizobiums font défaut.		
Abstract This experiment was part of a project meant to help reestablish a sustainable flora population in heavily polluted former sewage fields. Iron sludge was tested as an amendment in order to reduce the mobility of heavy metals in polluted soil. Two model species were picked to test the effect of this amendment : <i>Silene vulgaris</i> and <i>Trifolium pratense</i> . The amendment was added at 3 different rates : 2%, 4%, and 8% (of the total soil dry mass) as a way to identify the best application rate. The experiment was conducted in a greenhouse over the course of approximately 6 weeks. All plant material (shoot and root) was harvested, soil samples were also taken in rhizosphere and from pots without plants. Evapotranspiration data were also monitored during the experiment. Plant samples were dried at 60°C then weighed. Root systems were measured. Mobile heavy metal concentrations were measured in soil samples, as well as pH. Results showed promising growth increase for both model species, with a best application rate between 2% and 4% of iron sludge. Additional study was conducted on <i>Trifolium pratense</i> rhizobia behaviour in heavy metal polluted soil. Observations showed efficient nodulation but data on rhizobia characterisation is missing.		
Mots-clés : boue rouge, métaux lourds, phytostabilisation, biodiversité Key Words: red mud, iron sludge, heavy metals, phytostabilisation, biodiversity		