

Université de Montréal

**Phyto-extraction du zinc et de l'arsenic
par différentes espèces de plantes**

par Alexandre Licinio

Département des sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du grade de Maître ès sciences en sciences biologiques

Mai 2017

© Alexandre Licinio, 2017

Résumé

Mon projet de maîtrise avait pour but d'évaluer la faisabilité d'une solution de phytoremédiation par phyto-extraction d'un sol modérément contaminé en zinc et en arsenic. Cette évaluation s'est basée sur les résultats d'une expérience en pots réalisée dans un tunnel de croissance de l'Institut de recherche en biologie végétale (IRBV) durant l'été 2015. Le sol utilisé provenait directement du site contaminé. Les plantes choisies pour cette expérience étaient deux cultivars de saule, *Salix purpurea* 'Fish Creek' et *Salix miyabeana* 'SX67' ainsi que trois herbacées *Medicago sativa*, *Festuca arundinacea* et un mélange de plantes utilisé pour la stabilisation de sol. L'impact d'un agent chélateur (acide nitrilotriacétique, NTA) sur la phytoremédiation et le développement des espèces a également été étudié. Les saules ont extrait deux à trois fois plus de zinc que les herbacées. La tendance était inversée pour l'arsenic avec une extraction deux à trois fois plus grande chez les herbacées. Le chélateur NTA a eu un effet positif sur la biomasse aérienne des plantes et sur la phyto-extraction du zinc, mais pas sur la phyto-extraction de l'arsenic. Une diminution importante de la quantité de zinc et d'arsenic a été observée dans les sols. Cette diminution provient des effets combinés de la phyto-extraction et d'autres facteurs, comme la variabilité intrinsèque du sol ainsi que son lessivage. La phyto-extraction de l'arsenic a donné des résultats médiocres, quels que soient les traitements et les plantes utilisés. Les résultats obtenus démontrent l'efficacité des saules et le potentiel du chélateur NTA pour la phyto-extraction du zinc.

Mots-clés : phytoremédiation, phyto-extraction, Salix, NTA, zinc, arsenic

Abstract

My master project aimed to evaluate if phytoremediation by phytoextraction was a viable solution in cleaning up a moderately contaminated soil in zinc and arsenic. This evaluation was based on the results of a potted experiment done within Montreal Botanical Garden, in a growth tunnel set up by Institut de recherche en biologie végétale (IRBV). The soil was collected from a contaminated site. We chose the following plants species: two willow cultivars, *Salix purpurea* ‘Fish Creek’ and *Salix miyabeana* ‘SX67’, two grasses *Medicago sativa* L., *Festuca arundinacea* and a mix of grasses used for soil stabilization. The impact of a chelating agent (nitrilotriacetic acid, NTA) on phytoextraction and plant growth was also assessed. *Salix* extracted two to three time more zinc than the grasses. For arsenic, the opposite trend was observed, with two to three times more arsenic extracted by grasses. Chelator NTA had a positive effect on above ground biomass and overall phytoextraction of zinc, but not for arsenic phytoextraction. A significant diminution of zinc and arsenic was observed in soil after the experiment. This diminution comes from the combined effects of phytoextraction and other factors, such as intrinsic soil variability and its leaching. Arsenic phytoextraction was overall mediocre regardless of the species and treatments used. These results show the effectiveness of willows and potential from chelator NTA for zinc phytoextraction.

Keywords : phytoremediation, phytoextraction, *Salix*, NTA, zinc, arsenic

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des sigles.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	ix
Introduction.....	1
Mise en contexte et problématique.....	1
Revue de littérature.....	3
Contaminants inorganiques.....	3
L'élément zinc.....	3
L'élément arsenic.....	11
La phytoremédiation.....	14
Objectifs et hypothèses.....	23
Méthodologie.....	24
Improved phytoextraction of zinc and arsenic by addition of the chelating agent NTA.....	36
Conclusions générales et perspectives.....	64
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1.	Caractéristiques initiales du sol	26
Tableau 2.	Initial soil characteristics of the contaminated soil.....	55
Tableau 3.	Total metal concentration comparisons before and after the experiment for each pot, by species and NTA treatment.....	56
Tableau 4.	Soluble metal fraction of total metal concentration and comparisons of concentrations before and after the experiment for each pot, by species and NTA treatment.	58

Liste des figures

Figure 1.	Plan du dispositif expérimental.....	27
Figure 2.	Dispositif expérimental après trois mois de croissance.	28
Figure 3.	Dry above-ground biomass across all species, no chelator.....	60
Figure 4.	Metal concentration in above-ground biomass for all species, no chelator.....	61
Figure 5.	Metal extracted by all species, no chelator.	62
Figure 6.	Effect of NTA on biomass for the five species.....	63
Figure 7.	Effect of NTA on Zn extraction.....	63

Liste des sigles

ANOVA : Analyse de la variance

CCME : Canadian Council of Ministers of the Environment

COV : Composé Organique Volatil

DMA : Diméthylarsinate

DMS_e : Diméthylselenide

DMS : Diméthylsulfure

EPA : Environmental Protection Agency

ETM : Élément Trace Métallique

ET : Élément Trace

IRBV : Institut de Recherche en Biologie Végétale

HSD : Honest Significant Difference

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

MICE : Multivariate Imputation by Chained Equations,

MDDELCC : Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques

MMA : Méthylarsoneux

MTBE : Méthyl tert-butyl éther

NTA : Nitrilotricacetic Acid

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ROS : Reactive Oxygene Species

Liste des abréviations

As : arsenic

Cd : cadmium

DL50 : Dose Létale médiane

Pb : plomb

Zn : zinc

À tous ceux qui m'ont « supporté ».

Remerciements

Je tiens à remercier avant tout mes directeurs de maîtrise, Michel Labrecque et Frédéric Pitre, pour avoir accepté de diriger mon travail de maîtrise et m'avoir guidé à travers cette expérience.

Je remercie Hamida et Ahmed pour m'avoir guidé durant mes premiers jours à l'IRBV et au Jardin botanique de Montréal, pour leur aide avec la mise en place, le maintien et la récolte de l'expérience, ainsi qu'avec la préparation et l'analyse des échantillons. Merci aussi à Hamida pour les petits gâteaux et à Ahmed pour les nombreuses conversations.

Merci à Violette pour son aide avec la mise en place de l'expérience, la récolte et la préparation des échantillons. Pour ses bonnes histoires et ses convictions. À Allan pour m'avoir aidé à mettre en place l'expérience. À Stéphane pour ses explications et ses conseils sur les statistiques. À Nicolas pour m'avoir nargué dans les couloirs de l'IRBV. À Nicholas et Cédric pour leur aide et leurs conseils en matière de recherche et de rédaction.

Je remercie mes collègues de labo, Dominique, Karina, Maxime, Sonia, Aymeric, Esther, Simon, Vanessa et Maude pour leur soutien et leurs conseils ainsi que Julien du labo de pédologie. Je remercie également Anne-Marie, Richard, Denis et tout le personnel de l'IRBV et du Jardin botanique de Montréal de même que les étudiants des autres labos pour leur accueil, conseils et échanges.

Enfin, et non des moindres, je remercie mes parents pour leur confiance et leur soutien dans mon engagement pour ce projet et ma sœur pour son aide précieuse.

Introduction

Mise en contexte et problématique

Depuis le début de la révolution industrielle, les rejets de contaminants dans l'environnement ont augmenté de façon exponentielle. Devenue un problème majeur à l'échelle planétaire, la pollution environnementale s'accompagne de perturbations d'écosystèmes et de disparitions d'espèces vivantes. Malgré la mise en place par les gouvernements de réglementations et de restrictions, cette pollution demeure une préoccupation importante, en raison notamment de l'absence ou de la faiblesse de la réglementation encadrant les activités antérieures. Au Canada, 22 957 sites contaminés sont recensés à ce jour. Parmi ces sites, 5 332 nécessitent une remédiation ou sont en cours de remédiation (Treasury Board of Canada Secretariat, 2017). Au Québec, parmi les 2 394 sites contaminés recensés, 977 nécessitent une remédiation ou sont en cours de remédiation (Treasury Board of Canada Secretariat, 2017). Ces chiffres représentent les sites officiellement recensés, mais sous-estiment le nombre total de sites contaminés existant. La prise en charge de ces sites a pour objectif d'éviter la dissémination de la contamination dans l'environnement et, dans le meilleur des cas, de rétablir les écosystèmes.

Les procédures de décontamination conventionnelles sont souvent onéreuses et peuvent entraîner la destruction du sol, selon le type et la gravité de la contamination. Depuis plusieurs décennies, des méthodes alternatives de décontamination viennent remplacer ou compléter les méthodes conventionnelles, qui sont plus adaptées aux contaminations massives à petite échelle (Ruttens et al., 2011). Ces méthodes alternatives se démarquent souvent par un coût peu élevé, leur faisabilité sur de grandes surfaces et leur respect de l'environnement. Elles ne constituent

cependant pas des solutions miracles et des recherches sont nécessaires pour développer leur compétitivité face aux solutions conventionnelles (Witters et al., 2009).

Mon projet de maîtrise porte sur la décontamination d'un terrain modérément contaminé par des éléments traces (ET). La méthode choisie est celle de la phytoremédiation, un type de décontamination environnementale basé sur l'utilisation des plantes et des microbes qui leur sont associés (Pilon-Smits, 2005). Le terrain contaminé est situé dans la municipalité de Saint-Octave-De-Métis (QC) et est adjacent à une voie ferrée. La contamination date de 2004, lorsque le déraillement d'un train a entraîné le déversement de plusieurs centaines de tonnes de concentré de zinc et de cuivre. Bien qu'une grande partie du déversement ait été récupéré à l'épicentre de l'accident, la contamination s'est répandue dans les terrains alentours. Dans le sol des parcelles étudiées, elle est constituée de zinc et d'arsenic et est relativement modérée, entre les critères A-B du MDDELCC (MDDELCC, 2015). C'est justement parce que cette contamination modérée concernait des surfaces importantes qu'une solution alternative a été envisagée. Cette expérience avait pour but de déterminer les solutions de phyto-extraction les plus performantes parmi quatre espèces de plantes et un mélange de plantes, ainsi que d'évaluer les effets de l'ajout d'un agent chélateur dans le processus de décontamination du sol.

Revue de littérature

Cette revue de littérature présente notamment les contaminants rencontrés dans l'expérience et offre un aperçu des différentes méthodes de phytoremédiation.

Contaminants inorganiques

Les contaminants inorganiques se présentent sous forme minérale. Contrairement aux contaminant organiques, ils ne peuvent pas être dégradés et persistent dans l'environnement (Pilon-Smits, 2005). On retrouve dans cette catégorie les célèbres « métaux lourds » et des métalloïdes, qu'on appelle désormais « éléments traces métalliques ». Mon expérience concerne deux éléments traces : le zinc et l'arsenic.

L'élément zinc

Le zinc (Zn), de numéro atomique 30, est le 24^e élément le plus abondant sur Terre. Il est classé dans la catégorie des éléments de transition dans le tableau périodique et fait partie du groupe 12, dans la période 4 et dans le bloc d. Sa dernière orbitale d est donc remplie, ce qui lui donne des propriétés chimiques particulières et essentielles en biologie (Ishimaru et al., 2011). Le zinc est qualifié d'élément trace, avec des concentrations de fond dans les sols allant de 10 mg kg⁻¹ à plus de 100 mg kg⁻¹. On retrouve toutefois fréquemment des concentrations locales plus élevées en raison de la composition du matériel parental ou à la suite de dépositions (Alloway, 2013). Ainsi, dans les roches sédimentaires, les concentrations moyennes sont de l'ordre de 10 à 120 mg kg⁻¹, alors que dans la lithosphère les concentrations moyennes sont seulement de 70 à 80 mg kg⁻¹ (Barak & Helmke, 1993; Friedland & Shaw, 1989).

La principale source naturelle de zinc dans le sol provient de l'altération de la roche mère par son érosion physique et chimique. Le zinc forme de nombreux sels solubles tels que les sulfates, les halogénures et les nitrates, ainsi que d'autres composés peu ou non solubles. Il peut aussi former des complexes organiques solubles et non solubles (Barak & Helmke, 1993). Il existe d'autres sources naturelles de zinc, comme les émissions atmosphériques provenant d'éruption volcaniques, de feux de forêts et de poussières. On retrouve également des sources biologiques issues de la décomposition de matières organiques et du lessivage de la surface des feuilles par la pluie (Friedland & Shaw, 1989). Des concentrations très élevées en zinc dans les sols peuvent parfois survenir naturellement, lors d'une accumulation de certaines roches riches en zinc, formant des sols « calamines » (Barak & Helmke, 1993).

Le zinc est présent sous de multiples formes dans le sol que l'on peut classer en trois fractions distinctes (Broadley et al., 2007). La première fraction est la fraction soluble où se retrouvent les formes solubles du zinc, comme l'ion Zn^{2+} et le zinc associé à des ligands organiques solubles. Cette fraction est assimilable par les plantes. La deuxième fraction représente la partie échangeable du zinc avec la partie soluble. Elle est constituée du zinc adsorbé sur les argiles, les complexes humiques et les complexes d'oxydes (ces derniers constituant la fraction colloïdale du sol), dont les échanges avec la fraction soluble sont fortement influencés par les caractéristiques du sol. La troisième fraction est constituée de la partie insoluble du zinc, composée de formes minérales et complexées, indisponibles pour les plantes.

De nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques affectent la distribution du zinc dans le sol. Le pH est souvent cité comme facteur principal, mais d'autres facteurs influencent aussi la répartition du métal dans le sol. On cite généralement le type du sol, sa

composition en minéraux, en argiles et en matières organiques, sa capacité d'échange cationique, son humidité et les organismes présents dans le sols (plantes, champignons, micro-organismes) (Broadley et al., 2007). Dans bien des cas, cependant, le principal facteur responsable de la répartition du zinc à travers les fractions précédemment citées est bien le pH. En effet, plus le pH est élevé, plus le zinc est facilement adsorbé sur les sites d'échange de cations et n'est donc plus dans la fraction soluble. Par contre, plus le pH est faible, plus le zinc est facilement délogé de ces sites d'échange de cations par d'autres cations et se retrouve donc dans la fraction soluble (Broadley et al., 2007). La forme insoluble du zinc est la forme dominante dans le sol et représente plus de 90% de la quantité totale de zinc présente dans le sol (Broadley et al., 2007).

Aperçu du rôle du zinc dans la biologie végétale

Le zinc est un micronutriment essentiel pour les plantes et les animaux et joue un rôle important dans la physiologie et la biochimie de ces derniers (Kochian, 1993). En effet, le zinc est un élément nécessaire au bon fonctionnement de nombreux processus biologiques indispensables, tels que la synthèse de protéines et d'hormones ainsi que la fonction et l'activation et fonction de nombreuses enzymes. Il est d'ailleurs le seul élément métallique présent dans toutes les classes d'enzymes. Au sein de ces protéines et de ces enzymes, le zinc joue des rôles divers : des rôles structurels mais aussi des rôles dans la formation de sites catalytiques et co-catalytiques (Sousa et al., 2009). Le zinc est aussi important dans la liaison de protéines et des sous-unités de protéines et est également nécessaire à la stabilité structurelle des organelles (Marschner, 2011).

Une des caractéristiques chimiques importantes du zinc est que son ion Zn^{2+} n'a pas d'activité oxydoréductrice. Cette caractéristique en fait un candidat de choix pour les protéines et les enzymes qui doivent interagir avec des molécules importantes et délicates comme l'ADN et l'ARN. Le zinc est donc un constituant essentiel des ADN et ARN polymérase. L'utilisation d'un ion oxydoréducteur par ces enzymes pourrait endommager les acides nucléiques et entraîner la formation de radicaux libres (Ishimaru et al., 2011). Il existe de nombreuses autres enzymes tout aussi importantes dont le bon fonctionnement requiert du zinc, dont notamment la phosphatase alcaline (qui enlève un groupement phosphate) et l'anhydrase carbonique (à l'origine de l'inter-conversion de gaz carbonique et eau en bicarbonate et proton) (Marschner, 2011).

Le zinc est principalement absorbé par les plantes sous sa forme Zn^{2+} et associé à des ligands organiques de faible poids moléculaire, appelés phytosidérophores et sécrétés par les racines de la plante. Les phytosidérophores sont aussi responsables de l'absorption d'autres ions comme le Fe et Cu (Grusak et al., 1999). L'absorption du Zn dans la partie corticale de la racine passe par la voie apoplastique, tout particulièrement lorsque le zinc est contenu dans la solution du sol, et par la voie symplastique lorsque le zinc associé aux phytosidérophores. Le zinc transporté traverse par la suite l'endoderme de la racine et accède ainsi au xylème. Dans le xylème, le zinc se trouve sous forme chélatée (en association avec une autre molécule). Cela lui évite ainsi d'être lié à la paroi du xylème, qui est négativement chargée du fait de ses groupements carboxyles et a donc une forte affinité pour les cations divalents (Grusak et al., 1999). Le zinc passe par la suite dans le phloème, par le biais des cellules compagnes, et est distribué aux cellules des différents tissus de la plante (Taiz & Zeiger, 2010). Dans l'orge, Brune et al. (1994) ont déterminé que la majorité du zinc présent dans les feuilles se retrouvait dans le

protoplasme du mésophylle, puis dans le protoplasme épidermique et enfin dans l'apoplasme. Dans ce dernier, la majeure partie du zinc se retrouve dans la paroi cellulaire, et peut potentiellement servir de réserve de secours ou être recyclé par la plante car, contrairement à d'autres éléments comme le fer, le zinc est relativement mobile dans la plante (Grusak et al., 1999). Au sein des cellules du mésophylle, le zinc est principalement contenu dans le cytoplasme et les chloroplastes, alors que les vacuoles n'en contiennent généralement qu'une très faible quantité (Brune et al., 1994).

Besoins et déficiences en zinc.

Bien que le zinc ne soit nécessaire qu'en petite quantité dans les plantes, où une concentration allant de 15 à 30 mg kg⁻¹ de tissu est à la limite de la déficience (Marschner, 2011), les déficiences sont cependant communes et problématiques dans l'agriculture. En effet, les carences en zinc posent non seulement des problèmes pour les plantes elles-mêmes et mais aussi pour les êtres humains, dont la principale source de zinc se situe dans l'alimentation (Cakmak et al., 1999). Chez les dicotylédones, une déficience en zinc se manifeste par un retard de croissance, caractérisée par une diminution de la croissance des tiges et feuilles. Dans le cas d'une sévère déficience, un dépérissement des apex des branches peut apparaître. Chez les monocotylédones, une déficience en zinc se traduit également par un retard de croissance et par une chlorose et des taches nécrotique sur les vieilles feuilles (Marschner, 2011).

Les sources anthropiques de zinc

Les concentrations élevées de zinc provenant de sources naturelles sont relativement rares dans l'environnement, mais existent. Un exemple souvent cité est celui des sols calamines, constitués de roches riches en zinc comme l'hémimorphite et la smithonite (Barak & Helmke,

1993). Les sources de contamination et de pollution au zinc sont donc plutôt d'origine anthropique (Friedland & Shaw, 1989).

Les premières émissions anthropiques de Zn ont débuté involontairement avec l'extraction de divers métaux comme l'or et le cuivre. Le zinc est naturellement présent dans ces minerais (Alloway, 2013), mais n'est pas exploité pur du fait de sa faible température de fusion et d'ébullition, qui rend son extraction difficile. Bien que le zinc ait été depuis longtemps utilisé sous forme alliage (comme le laiton), ce n'est qu'au XIII^e siècle que la production de zinc débute en Asie, suivie au XVIII^e siècle d'une production industrielle en Europe (Alloway, 2013; Habashi, 2002). Ainsi, les émissions de zinc, qui étaient de l'ordre de 10 000 tonnes par an il y a 2 000 ans, ont culminé à 3,4 millions de tonnes par an dans les années 1980 avant de redescendre à 2,7 millions de tonnes par an dans les années 1990 (Nriagu, 1996). Friedland et Shaw (1989) ont estimé à 20 pour 1 le ratio d'émissions de zinc anthropique par rapport aux émissions naturelles, démontrant l'écrasante ampleur des émissions anthropiques.

De nos jours, les industries métallurgiques et minières sont les principales sources de production et d'émissions de zinc. Cependant, l'agriculture, avec les engrais et les fumiers, les boues d'épurations, le lessivage de surfaces galvanisées, les combustibles fossiles ou encore les pneus en caoutchouc constituent d'autres sources importantes d'émissions de zinc dans l'environnement (Alloway, 2013; Chaney, 1993).

Excès et toxicité du zinc

La toxicité du zinc apparaît surtout dans les milieux contaminés, généralement par des sources anthropiques, mais aussi lorsque le pH du sol est faible (Chaney, 1993), et que le zinc est plus facilement biodisponible pour les plantes. Dans la plupart des cas, les symptômes de toxicité au zinc apparaissent quand la concentration de zinc dans les feuilles est supérieure à 300 mg kg^{-1} de matière sèche. Ces symptômes se manifestent parfois aussi à des concentrations inférieures à 100 mg kg^{-1} de matière sèche chez certaines espèces de plante. Les seuils de toxicité dépendent de beaucoup de facteurs et peuvent donc être très variables (Chaney, 1993; Marschner, 2011).

Les symptômes de toxicité au zinc chez les plantes prennent souvent la forme de retard de croissance et de flétrissements des parties aériennes (Broadley et al., 2007). Un autre symptôme fréquemment observé est la chlorose, qui entraîne un jaunissement des feuilles entre les nervures. Un excès de zinc perturbe le bon fonctionnement cellulaire en dégradant les chloroplastes et l'absorption de minéraux tels que le phosphore, magnésium et manganèse, ce qui perturbe la synthèse de chlorophylle (Boawn & Rasmussen, 1971; Carroll & Loneragan, 1968; Chaney, 1993; Foy et al., 1978). Dans une expérience s'intéressant aux effets du zinc sur la physiologie et la croissance du bambou *Phyllostachys pubescens*, Peng et al. (2015) démontrent non seulement qu'une déficience en zinc entraîne un retard de croissance et une diminution de la concentration en chlorophylle, mais aussi qu'une exposition de la plante à un excès de zinc (aux alentours de 400 mg k^{-1} de tissu) entraîne des symptômes semblables. Les symptômes de carence et de toxicité liés au zinc sont peu spécifiques et sont similaires à des symptômes de déficiences et d'excès d'autres micronutriments. Il est donc nécessaire d'avoir

recours à des analyses chimiques des tissus de la plante ou du sol pour s'assurer que le Zn est bien la cause des symptômes observés (Beyer et al., 2013).

Bien que la chimie du sol joue un rôle important, la sensibilité à la toxicité du zinc dépend également des plantes. Dans les sols acides, les monocotylédones sont moins sensibles à la toxicité du zinc que les dicotylédones, alors que c'est l'inverse dans les sols aux pH alcalins (Chaney, 1993). De plus, les dicotylédones dont la couverture foliaire est particulièrement développée, comme les épinards et les betteraves, sont plus sensibles aux effets toxiques du zinc du fait de leur grande capacité d'absorption du Zn (Boawn & Rasmussen, 1971; Chaney, 1993). Des variations génétiques au sein même d'une espèce de plantes peuvent également entraîner des sensibilités différentes au zinc. Cela a été observé chez le soja (*Glycine max L.*) et le riz (*Oriza sativa L.*) (Dong et al., 2006; Earley, 1943; White et al., 1979). Enfin, certaines plantes sont capables de supporter des quantités importantes de zinc dans leurs tissus sans montrer aucun symptôme de toxicité, cela à hauteur de 1% du poids sec, équivalent à 10 mg g⁻¹, de leurs parties aériennes. Ces plantes sont appelées « hyperaccumulatrices » et peuvent se développer sur des terrains contaminés en Zn (Baker & Brooks, 1989). Par exemple, *Thalspi caerulescens* est une espèce hyperaccumulatrice capable d'accumuler jusqu'à 3% de son poids sec en Zn sans aucun symptôme de toxicité visible (Brown et al., 1995).

Malgré ses effets toxiques sur les plantes, le zinc est considéré comme relativement peu toxique, car sa toxicité sur les êtres humains est faible (Duruibe et al., 2007) et se situe bien en-dessous de la toxicité, très élevée, d'autres contaminants métalliques comme le Cd, le Hg ou encore le Pb (Kabir et al., 2012). Le zinc est un élément essentiel dans la réalisation des processus biologiques, cependant les problèmes qui y sont liés sont doubles. D'un côté, les carences en zinc menacent les cultures agricoles et la santé humaine. De l'autre, les rejets

anthropiques dans l'environnement perturbent, voire neutralisent la croissance végétale sur les sols contaminés. Dans ces situations, les plantes s'adaptent, évoluent ou dépérissent mais, dans les cas où le problème est trop important, le rétablissement des milieux peut nécessiter une intervention humaine.

L'élément arsenic

L'arsenic est un élément chimique de symbole As et de numéro atomique 33, classé dans la colonne 15 du tableau périodique. Ses propriétés chimiques se situent entre celles d'un métal et d'un non-métal, ce qui le classe dans la catégorie des métalloïdes. Il possède quatre états d'oxydation : arsine (-3), métal (0), arsénite (+3) et arséniate (+5). En plus de ses formes inorganiques, l'arsenic possède des formes organiques naturelles tels que l'acide méthylarsonieux (MMA) et le diméthylarsinate (DMA) (Hettick et al., 2015). Les concentrations de fond de l'arsenic dans le sol vont de 0,1 à 55 mg kg⁻¹, avec des concentrations de l'ordre de 4,8 à 13,6 mg kg⁻¹ dans les sols du Canada (Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2001). Pour le Québec, les concentrations de fond sont de l'ordre de 6 à 15 mg kg⁻¹, selon les différents profils géologiques existants (MDDELCC, 2015).

Sources naturelles et anthropiques

Les principales sources de contamination environnementale sont à la fois naturelles et anthropiques. Les sources naturelles proviennent principalement de l'altération de la roche-mère. Certaines roches comme les schistes, les phosphorites et les argiles ont une teneur généralement plus élevée en As que les autres types de roches (Alloway, 2013). Les sources anthropiques sont principalement d'origine industrielle. Dans le cas des exploitations minières et de la fonte de métaux, l'arsenic est présent dans les minerais (comme le cuivre). On le retrouve

également lors de l'utilisation de combustibles fossiles (Matschullat, 2000). L'arsenic était également utilisé comme insecticide, pesticide et herbicide (Bhattacharya et al., 2007; Smith et al., 2006).

Rôle dans la biologie et toxicité

L'arsenic n'est pas un élément essentiel dans la biologie et possède une toxicité élevée pour les plantes et les animaux (Lombi et al., 2002; Ng et al., 2003). La toxicité de l'arsenic dépend de ses formes et il en va de même pour son absorption par les plantes. Sous la forme (+3) l'arsenic peut passer par les aquaporines, et sous la forme (+5), il forme de l'arséniate (AsO_4^{3-}), imite le phosphate (PO_4^{3-}) et peut donc emprunter les transporteurs de phosphate pour entrer dans la plante. Une fois dans la plante, l'arséniate est réduit en arsénite par l'enzyme arséniate réductase, et peut même être par la suite méthylyé pour former des composés organiques, tels que le MMA et le DMA (Farooq et al., 2016). Dans la plante, l'arsenic affecte les fonctions catalytiques et entraîne la formation de ROS (Reactive Oxygen Species) (Farooq et al., 2016; Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

Des concentrations excessives d'As dans le sol peuvent causer des symptômes de toxicité chez les plantes, tels que des chloroses, des nécroses, une inhibition de la croissance, voire entraîner leur mort (Rosas-Castor et al., 2014). Certaines plantes situées dans des milieux contaminés possèdent des mécanismes de défense qui leur permettent de limiter leurs transporteurs de phosphates, et ainsi de limiter l'absorption d'arséniate (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002). Une fois dans la plante, l'arsenic peut être séquestré dans la vacuole ou complexé avec des phytochélatines (Farooq et al., 2016). Cette toxicité chez les plantes peut être transmise chez les animaux par le biais de la chaîne alimentaire. Cela touche aussi les êtres

humains par le biais de l'agriculture. Certaines céréales comme le riz peuvent accumuler dans leurs grains des quantités toxiques pour une consommation régulière (Chakraborty et al., 2014; Li et al., 2014).

L'arsenic est fortement toxique pour les êtres humains dans ses formes inorganiques, avec une LD_{50} de 10-20 mg kg⁻¹ (Le et al., 2000). De plus, une exposition régulière à de petites doses d'arsenic peut entraîner des symptômes de toxicité chronique. Chez l'humain, une des principales voies de contamination est l'eau potable (Hu et al., 2015). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA) établissent le seuil de toxicité de l'As à 10 µg L⁻¹ pour l'eau potable (Hettick et al., 2015), mais cette limite est bien souvent dépassée dans les pays en voie de développement (Mandal & Suzuki, 2002). L'arsenic est un des contaminants inorganiques affectant les écosystèmes et les humains les plus importants du fait de sa forte toxicité et de son omniprésence dans la biosphère.

La phytoremédiation

La phytoremédiation est l'utilisation des plantes et des micro-organismes qui leur sont associés pour la décontamination environnementale. Cette décontamination s'effectue par des processus naturels tels que la dégradation, l'absorption et la séquestration de polluants organiques et inorganiques par les plantes (Pilon-Smits, 2005).

Dans le cas de milieux contaminés, la phytoremédiation peut constituer une alternative intéressante aux méthodes conventionnelles de décontamination du sol que sont l'excavation, l'enfouissement, le lavage, la combustion ou encore le pompage et le traitement. Ces méthodes nécessitent des engins lourds (pelleuses, camions et bulldozers) pour la manipulation, le transport et, s'il y a lieu, le traitement des sols. Elles sont donc en général utilisées *ex situ* (Pilon-Smits, 2005).

Avantages de la phytoremédiation par rapport aux méthodes conventionnelles

La phytoremédiation, qui consiste en la plantation d'espèces végétales directement sur le terrain à décontaminer, a l'avantage d'être une approche *in situ*. L'utilisation de plantes permet de conserver la couche arable du sol, et donc de protéger l'intégrité de ce dernier (Mench & Schwitzguébel, 2009). C'est une solution « verte », écologique, bien perçue par le grand public par rapport aux engins lourds et aux produits chimiques que nécessitent les méthodes conventionnelles de décontamination (Pilon-Smits, 2005). La phytoremédiation est également une méthode de décontamination économique, adaptée aux grands terrains pollués, pour lesquels le coût d'une décontamination conventionnelle serait prohibitif (Garbisu & Alkorta, 2003).

Inconvénients de la phytoremédiation

La phytoremédiation n'est pas une solution miracle. Une de ses faiblesses concerne le niveau de contamination qu'elle permet de traiter. Si la contamination est trop importante, il est possible que les plantes ne puissent pas croître convenablement et faire leur travail de décontamination. Dans ce cas, il est plus efficace de recourir aux méthodes conventionnelles (Pilon-Smits, 2005).

D'autre part, pour que la remédiation du contaminant ait lieu, il faut que celui-ci soit accessible. Le contaminant peut se présenter sous une forme non biodisponible pour la plante. Comme celle-ci ne peut l'absorber, elle ne pourra ni le dégrader ni l'accumuler dans ses tissus. Le contaminant peut aussi être logé en profondeur, hors de portée des racines de certaines espèces végétales (Flechas & Latady, 2003). Enfin, le processus de phytoremédiation est lent. Il faut compter au moins une dizaine d'années pour décontaminer un sol ou le ramener à un niveau de pollution acceptable selon les normes environnementales (Pilon-Smits, 2005).

Stratégies de phytoremédiation

Dans le domaine de la phytoremédiation, on retrouve différentes stratégies de décontamination, chacune appropriée à une contamination et à une problématique spécifique. Pour les contaminants organiques, on recourt à des stratégies de phytostimulation, phytodégradation et ou phytovolatilisation. Pour les contaminants inorganiques comme les éléments traces métalliques (ETM), des stratégies de phytostabilisation et de phyto-extraction sont appliquées. Il est important de noter que ces stratégies ne sont pas mutuellement exclusives et peuvent se produire en parallèle. Dans un marais filtrant, par exemple, des processus de stabilisation et de volatilisation peuvent avoir lieu simultanément.

Les qualités générales recherchées chez les espèces végétales utilisées en phytoremédiation sont une croissance rapide, une forte biomasse, la capacité à tolérer la contamination et une bonne adaptation à l'environnement. Certaines stratégies de phytoremédiation requièrent des qualités particulières chez les plantes. Par exemple, pour la phyto-extraction, les espèces végétales recherchées sont celles qui permettent l'absorption, le transport et l'accumulation des contaminants dans les parties aériennes. En phytodégradation, on recherche plutôt un système racinaire très développé sécrétant de fortes quantités d'enzymes dégradantes. En phytostimulation, l'espèce recherchée possède un système racinaire développé, doté d'une grande quantité de racines pour soutenir la croissance microbienne ainsi que d'exsudats racinaires pour faciliter la dégradation du contaminant (Pilon-Smits, 2005).

Phytoremédiation de contaminations inorganiques

Deux stratégies de phytoremédiation sont principalement utilisées pour traiter les cas de contaminations inorganiques : la phytostabilisation et la phyto-extraction (Pilon-Smits, 2005).

La phytostabilisation a pour but de stabiliser le contaminant dans le sol, c'est à dire d'éviter sa dissémination en limitant l'érosion et le lessivage (Pilon-Smits, 2005). Le couvert végétal protège également le sol du vent et limite la dispersion aérienne des contaminants sous forme de poussières. Une autre façon de stabiliser et de neutraliser un contaminant dans le sol est de le rendre indisponible aux végétaux en le transformant en précipité ou favorisant son adsorption sur les particules du sol (Ruttens et al., 2006; Vangronsveld et al., 1995). Cette stratégie permet de diminuer l'impact d'une contamination et d'instaurer une décontamination par phytoremédiation ou bien de limiter la pollution dans l'attente d'une future décontamination. La séquestration de contaminants dans les racines, et non dans les parties aériennes, est aussi

considérée comme une stratégie de phytostabilisation, car elle empêche les polluants de se disséminer ou de passer dans la chaîne alimentaire (Alkorta et al., 2010). Dans une étude de Testiati et Parinet (2013), les auteurs évaluent l'utilisation de plantes locales méditerranéennes, adaptées au climat et tolérantes à la contamination, telles que la globulaire buissonnante (*Globularia alypum*) et le romarin (*Rosmarinus officinalis*), pour phytostabiliser les terrains contenant des résidus miniers contre l'érosion due au vent.

Dans le cas d'une phytostabilisation dite « chimique », il est nécessaire de coupler la plante avec un amendement tamponnant le pH. Par exemple, l'utilisation de raygrass anglais (*Lolium perenne*) en combinaison avec un amendement de compost et de chaux a donné des résultats prometteurs dans la stabilisation d'un sol minier très acide et contaminé au plomb, zinc et cuivre (Alvarenga & Gonçalves, 2008).

Dans la phyto-extraction, les plantes extraient le contaminant du sol et l'accumulent dans leurs parties aériennes. Par la suite, ces dernières sont récoltées et peuvent être réutilisées comme biodiesel (Witters et al., 2012), par exemple, ou encore être traitées par combustion pour la récupération des métaux. Cette méthode de phytoremédiation concerne surtout les contaminants inorganiques tels que les métaux et les radionucléides (Ali et al., 2013; Pilon-Smits, 2005). L'efficacité de cette remédiation dépend cependant de nombreux facteurs. Tout d'abord, le contaminant doit être suffisamment disponible pour les plantes. Cela dépend non seulement du contaminant lui-même, mais aussi des propriétés du milieu contenant le contaminant, comme le pH et la capacité d'échange cationique (Pilon-Smits, 2005).

Le choix des espèces de plantes à utiliser est également très important. Les plantes ne sont pas toutes adéquates pour la phyto-extraction (Pilon-Smits, 2005). Les auteurs Ali et al. (2013)

ont compilé une liste des qualités importantes chez les plantes utilisées en phyto-extraction :

- une croissance rapide
- une production importante de biomasse
- un système racinaire développé
- bonnes réponses au recépage répété
- la tolérance à de fortes concentrations de contaminant
- l'absorption et l'accumulation du contaminant dans les parties aériennes
- l'acclimatation au milieu et à l'écosystème.

Certaines plantes dites « hyperaccumulatrices » ne possèdent pas l'ensemble de ces propriétés, mais restent intéressantes dans le domaine de la phytoextraction. Les plantes hyperaccumulatrices sont définies par leur capacité à extraire et accumuler dans leurs tissus plus de 1% de leur poids sec en éléments traces métalliques (Baker & Brooks, 1989). Une des espèces souvent mentionnées est *Thalspi caerulescens*, qui possède la capacité d'accumuler jusqu'à 3% de son poids sec en éléments traces métalliques (Brown et al., 1995). Les plantes hyperaccumulatrices sont finalement peu adaptées à la décontamination à grande échelle en raison de leur lente croissance et de la faible quantité de biomasse qu'elles génèrent (Pilon-Smits, 2005). Cependant, dans le cas de certains contaminants, les plantes hyperaccumulatrices peuvent être intéressantes. Ainsi, l'arsenic n'est pas bien toléré, et encore moins accumulé, par la grande majorité des plantes. Toutefois, de nombreuses études ont montré que la fougère *Pteris vittata*, une plante hyperaccumulatrice, tolère et surtout accumule efficacement l'arsenic dans ses parties aériennes (Danh et al., 2014).

Parmi les végétaux se conformant aux propriétés recherchées en phyto-extraction, on retrouve des herbacées comme la moutarde indienne (*Brassica juncea*), le tournesol (*Helianthus*

annuus) ou encore la fétuque (*Festuca spp*) et la luzerne (*Medicago sativa*) (Bryson & Barker, 2007; Peralta-Videa et al., 2004; Pilon-Smits, 2005). Certains arbres et arbustes de la famille des Salicacées, comme les peupliers (*Populus spp*) et les saules (*Salix spp*), sont connus pour leur bonne tolérance aux contaminants organiques et inorganiques et conservent une croissance rapide tout en continuant de générer une quantité importante de biomasse (Pilon-Smits, 2005). Selon Algreen et ses collaborateurs (2014), les salicacées comptent parmi les espèces d'arbres qui accumulent le plus d'éléments traces métalliques dans leur bois. Ces auteurs évaluent la capacité de phyto-extraction de plusieurs éléments traces métalliques (cadmium, cuivre, nickel et zinc) dans différents milieux contaminés contenant chacun différentes espèces de saules et de peupliers. Ils démontrent l'excellente capacité de ces végétaux à accumuler dans leurs tissus les différents éléments traces métalliques ainsi que leur fort potentiel dans le domaine de phytoremédiation.

Similaire à la phyto-extraction, la rhizofiltration utilise les racines des plantes pour extraire les contaminants présents dans les eaux de surfaces et les accumuler dans la plante (Ali et al., 2013). Cependant, comme le volume d'eau traité par les racines est relativement faible, cette solution est plutôt intéressante dans un environnement contrôlé. On l'utilise notamment sous la forme d'installations hydroponiques, qui ciblent des contaminants en faible concentration mais très toxiques (Pilon-Smits, 2005). Ces contaminants peuvent être des éléments traces métalliques comme le cadmium, le plomb, mais aussi les radionucléides comme l'uranium (Lee & Yang, 2010). Dans l'article de Lee et Yang (2010), les auteurs testent avec succès l'utilisation du tournesol (*Helianthus annuus*) et du haricot commun (*Phaseolus vulgaris var. vulgaris*) pour l'extraction de radionucléides d'uranium en solution dans l'eau.

Utilisation d'un chélatant

Parce que la biodisponibilité des métaux dans les sols est un problème récurrent en phytoremédiation, et surtout en phyto-extraction, l'utilisation de substances chélatrices est souvent envisagée dans les projets de décontamination (Alkorta et al., 2004). Les chélateurs sont des substances chimiques qui augmentent la solubilité et la biodisponibilité des métaux présents dans le sol et les rendent plus aisément absorbables par les plantes, ce qui facilite, voire accélère, le processus de phytoremédiation (Farid et al., 2013; Wenzel et al., 2003).

Cependant, l'utilisation de certains chélateurs peut avoir un effet négatif sur l'environnement. Ainsi, l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est efficace, mais cause le lessivage des métaux dans les eaux souterraines et a des effets néfastes sur la microbiologie du sol (Shahid et al., 2013; Wenzel et al., 2003). Des alternatives plus écologiques sont recherchées. Par exemple, le chélateur acide nitrilotriacétique (NTA) est rapidement biodégradé dans les sols et donc potentiellement moins problématique (Meers et al., 2004).

Phytoremédiation de contaminations organiques

Bien que les contaminants organiques ne fassent pas partie de ceux retrouvés dans cette expérience, ils restent cependant un pan important du domaine de la phytoremédiation. De plus, dans bien des cas, les contaminations dans les sols sont souvent mixtes (organiques et inorganiques). Pour les contaminants organiques, on recourt à des stratégies de phytostimulation, phytodégradation et ou phytovolatilisation (**Pilon-Smits, 2005**).

La phytostimulation (également appelée rhizostimulation) consiste en la dégradation de contaminants organiques par les microbes présents dans la rhizosphère des espèces végétales utilisées. Les plantes elles-mêmes sont incapables de dégrader ou d'absorber ces contaminants, mais fournissent un habitat propice aux micro-organismes capables de les dégrader (Pilon-

Smits, 2005). Dans l'article de Martin et al. (2014) les auteurs soulignent l'importance des substances produites par les racines dans le processus de dégradation des hydrocarbures par les micro-organismes. Les différents sucres et acides aminés sécrétés par les racines de la plante favorisent le développement microbien de la rhizosphère. Les racines constituent aussi un habitat pour les mycorhizes, qui peuvent apporter des composés chimiques facilitant la solubilité des hydrocarbures pétroliers ou empêchant leur adsorption sur les particules du sol. De plus, il est possible que des molécules sécrétées par la racine et ressemblant aux hydrocarbures, comme les flavonoïdes, mettent en place un co-métabolisme qui induit des réactions métaboliques permettant la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Martin et al., 2014).

La phytodégradation dégrade les contaminants organiques en substances inoffensives ou moins toxiques par le biais de processus enzymatiques à l'œuvre au sein même de la plante (Gerhardt et al., 2009). Ces processus peuvent minéraliser les contaminants organiques et engendrer des substances telles que l'eau, le gaz carbonique etc. (Pilon-Smits, 2005). Parmi les contaminants organiques dégradés par les plantes, on retrouve le trinitrotoluène (le fameux explosif « TNT ») ou l'herbicide atrazine. Dans le cas de l'atrazine, Marecik et al. (2012) ont montré que non seulement l'acore odorant (*Acorus calamus*) résiste à la présence de fortes quantités de ce contaminant, mais qu'il peut aussi dégrader celui-ci en milieu aquatique.

Dans la stratégie de phytovolatilisation, le contaminant présent dans le sol est absorbé par la plante, dont il s'échappe ensuite sous forme volatile. Ce procédé concerne principalement les contaminants organiques volatiles (COV). Ces COV ne sont pas transportés activement, mais se diffusent librement dans la plante du fait de leur hydrophobicité en suivant la voie de l'évapotranspiration (Pilon-Smits, 2005; Winnike- McMillan & Zhang, 2003). Dans l'article de McMillan et Zhang (2003), les auteurs évaluent la capacité des peupliers hybrides (*Populus*

deltoides x nigra) à « pomper » et à diffuser hors du sol le COV méthyl tert-butyl éther (MTBE). Il faut noter que cette stratégie de phytoremédiation ne se limite pas aux contaminants organiques. En effet, certains contaminants inorganiques comme le sélénium, le mercure et l'arsenic peuvent être également volatilisés sous certaines formes (Sakakibara & Watanabe, 2010). Par exemple, le sélénium est volatilisé sous forme de DMSe (dimethylselenide), car il emprunte les mêmes processus métaboliques que le soufre, qui est transformé en diméthylsulfure (DMS) (Anderson, 1993). Des plantes comme le riz (*Oryza sativa*), le brocoli (*Brassica oleracea botrytis*), le chou (*Brassica oleracea capitata*) ou encore la fétuque (*Festuca arundinacea*) volatilisent efficacement le sélénium (Terry & Zayed, 2000).

En conclusion

La phytoremédiation peut survenir passivement sur les terrains contaminés. Ce phénomène, appelé atténuation naturelle, a lieu sur des terrains peu contaminés et non utilisés par les humains et n'est pas très efficace (Pilon-Smits, 2005). En effet, pour obtenir de bons résultats, il est important de bien connaître le sol, le ou les contaminants et les espèces de plantes utilisées et de choisir la stratégie de phytoremédiation adaptée. Lorsque la contamination est trop importante ou que la décontamination est urgente, les méthodes de décontamination conventionnelles restent plus adaptées (Flechas & Latady, 2003).

Il ne faut pas oublier que la phytoremédiation et les méthodes conventionnelles ne sont pas mutuellement exclusives. Il peut être avantageux de les jumeler et d'assigner aux méthodes conventionnelles les terrains les plus pollués et à la phytoremédiation les parties moins touchées. La phytoremédiation peut être également envisagée en complément d'une décontamination conventionnelle (Pilon-Smits, 2005).

Objectifs et hypothèses

L'objectif principal de ma maîtrise était d'évaluer le potentiel d'une sélection de plantes à phytoremédier un sol modérément contaminé avec du zinc et de l'arsenic.

Les objectifs spécifiques étaient :

- De comparer les capacités des espèces de plantes sélectionnées à extraire les contaminants (zinc et arsenic) du sol.
- D'évaluer les effets du traitement de chélation avec du NTA.
- D'attester de la contamination du sol en zinc et arsenic.

Les hypothèses sont :

- Les différentes espèces testées vont accumuler le zinc et l'arsenic différemment dans leurs parties aériennes.
- L'ajout de NTA va augmenter les fractions solubles du zinc et de l'arsenic dans le sol et augmenter l'absorption par les plantes.
- Les quantités de zinc et d'arsenic dans le sol vont diminuer suite à leur absorption et accumulation par les différentes espèces de plantes.

Méthodologie

L'expérience a été réalisée durant l'été 2015 dans le tunnel de croissance de l'IRBV au complexe Louis-Dupire, situé sur le site du Jardin botanique de Montréal. La mise en pots des plantes a débuté le 15 juin et la récolte a eu lieu le 15 septembre, après un total de trois mois de croissance.

Espèces végétales choisies

Quatre espèces et un mélange de plantes ont été choisis, pour un total de cinq traitements.

Le saule pourpre (*Salix purpurea* cv 'Fish Creek')

Salix purpurea est une espèce de saule originaire de l'Amérique du nord. Utilisée avec succès dans plusieurs expériences de phytoremédiation, son cultivar 'Fish Creek' se caractérise par une croissance rapide accompagnée d'une grande génération de biomasse. Il tolère très bien de fortes concentrations de contaminants. De plus, il a fait l'objet de nombreuses analyses transcriptomiques dans un contexte de pollution environnementale pour le projet GenoRem (Genomics Phytoremediation) (Brereton et al., 2016; Gonzalez et al., 2015)

Le saule miyabeana (*Salix miyabeana* 'SX67')

Cette espèce de saule est originaire d'Asie. Plusieurs de ses cultivars, dont le 'SX67', sont utilisés en phytoremédiation en raison de leur bonne tolérance aux contaminations organiques et inorganiques ainsi que de leur importante génération de biomasse. Le 'SX67' a également été utilisé dans le cadre du projet GenoRem (Grenier et al., 2015; Hassan et al., 2014).

La luzerne (*Medicago sativa*)

La luzerne est une légumineuse utilisée en phytoremédiation à travers le monde. C'est une plante efficace pour traiter les contaminations à base d'hydrocarbures, mais aussi les

contaminations à base d'éléments traces métalliques comme le zinc. Sa capacité de fixation de l'azote permet aussi un enrichissement des sols pauvres, au rapport carbone/azote trop élevé, souvent retrouvés en phytoremédiation (Chekol & Vough, 2001; Leys et al., 2005; Peralta-Videa et al., 2004).

La fétuque (*Festuca arundinacea*)

La fétuque est une herbacée dont les différentes espèces sont couramment utilisées pour la phytoremédiation. Elle possède une forte tolérance à la pollution aussi bien organique qu'inorganique tout en ayant un bon potentiel de phyto-extraction (Batty & Anslow, 2008; Bryson & Barker, 2007).

Le mélange « stabilisation indigène » de la firme Indigo

Comme son nom l'indique, ce mélange est constitué de plantes herbacées indigènes au Québec. Le but premier de ce mélange est la stabilisation des sols par l'intermédiaire d'une structure racinaire dense que forment les espèces incluses dans cet assortiment. Cette structure racinaire dense peut augmenter l'absorption des contaminants et favoriser la phyto-extraction (Pilon-Smits, 2005).

Les proportions des espèces contenues dans le mélange sont les suivantes :

25,00% Festuca rubra, 14,50%, Poa pratensis, 10,00%, Panicum virgatum, 10,00% Andropogon gerardii, 10,00% Avena sativa, 10,00%, Deschampsia cespitosa, 10,00%, Elymus canadensis, 5,00%, Lolium multiflorum, 4,00%, Elymus trachycaulus, et 1,50% Spartina pectinata.

Sol utilisé

Le sol contaminé utilisé dans cette expérience provient directement du site contaminé situé à Saint-Octave-De-Métis (QC), où en 2004 un déraillement de train a entraîné le déversement de plusieurs centaines de tonnes de concentré de zinc et de cuivre. Plusieurs tonnes de sol provenant des parties modérément contaminées du terrain ont été livrées dans quatre sacs conteneurs. Avant la mise en pots, le sol a été sorti des quatre sacs et homogénéisé sur une bâche, à l'aide de pelles et de râtaux, afin d'obtenir une concentration de la contamination la plus uniforme possible. Un échantillon de sol (t0) pour chaque pot a été prélevé avant le début de l'expérience.

Tableau 1. Caractéristiques initiales du sol

Texture du sol	Limoneuse
Argile (%)	24.2 ± 0.5
Limon (%)	37.8 ± 3.4
Sable (%)	39.5 ± 5.7
Matière organique (%)	5.7 ± 0.3
pH*	5.4 ± 0.1
CEC (meq 100g ⁻¹)	18.5 ± 0.5
Azote total (g kg ⁻¹)	2.97 ± 0.06
Zn (mg kg ⁻¹)	420.9 ± 45.4
As (mg kg ⁻¹)	7.52 ± 0.3

Réalisé à partir de trois échantillons de sol. pH est le pH de l'eau du sol.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental, de design split-plot, comptait 120 pots divisés en cinq blocs (figure 1). L'expérience incluait des pots plantés avec les espèces sélectionnées ainsi que des pots témoins non plantés pour suivre l'effet des espèces sur la décontamination des sols.

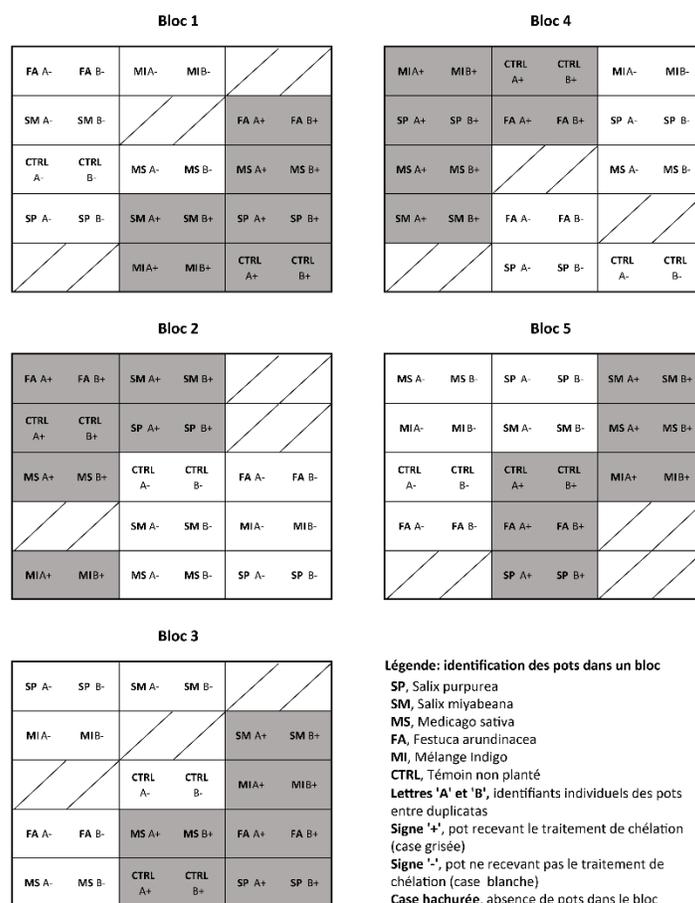


Figure 1. Plan du dispositif expérimental. Les sols ont été répartis dans 5 blocs de 24 pots, pour un total de 120 pots. Parmi ces 120 pots, 60 sont uniques selon la combinaison de l'espèce et du traitement qu'ils contiennent. Les 60 autres pots sont des duplicatas des 60 pots originaux, et sont chacun groupés avec ces derniers (une case équivaut à une paire de pot identique). Les positions des paires de pots ont été tirées au hasard au sein du split-plot, dans chaque bloc.



Figure 2. Dispositif expérimental après trois mois de croissance. La récolte a eu lieu quelques jours après la prise de cette photographie (16 septembre 2015).

Traitements, mesures et manipulations

Traitement de chélation

L'agent de chélation choisi dans cette expérience est l'acide nitrilotriacétique ou NTA, sous la forme de sel trisodique monohydraté. Le NTA est un agent de chélation peu persistant et rapidement biodégradé dans l'environnement. Il est moins néfaste que l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). De plus, il est relativement efficace dans un contexte de phytoremédiation du zinc (Alkorta et al., 2004; Kayser et al., 2000).

L'application du chélateur a débuté 30 jours après la mise en terre des plantes sous la forme d'une solution de 50 ml répartie à la surface des pots. Le chélateur a été appliqué de façon répétée et en petites doses afin de minimiser le stress occasionné aux végétaux tout en conservant une bonne efficacité d'action. Au total, huit applications ont été réalisées à intervalle de cinq jours pour une concentration totale de NTA de 2 mmol par kilogramme de sol. Les plantes qui n'ont pas reçu le traitement de chélation ont reçu une dose égale d'eau.

Mesures de croissance

Trois semaines après la mise en pot, les premières mesures de croissance ont été réalisées. Elles ont ensuite été effectuées toutes les deux semaines. Ces mesures ne concernaient que les saules (*Salix miyabeana* et *Salix purpurea*) et consistaient à compter le nombre de branches, relever le diamètre et la longueur de la branche principale (conservée au cours des mesures ultérieures) à l'aide d'un pied à coulisse et d'un ruban à mesurer. De plus, des mesures de concentration de chlorophylle ont été réalisées à hauteur de cinq mesures par arbustes à l'aide d'un *Leaf chlorophyll meter* de la marque *AtLeaf*. Enfin, une mesure de la conductance

stomatique a été réalisée sur chaque saule à l'aide d'un *Leaf porometer* de la marque *Decagon Devices*.

Entretien

Les plantes ont été arrosées quotidiennement selon leurs besoins. Un désherbage quasi quotidien a été effectué et des inspections hebdomadaires pour les maladies et les insectes ont été réalisées.

Récolte

La récolte s'est déroulée en deux étapes. La première étape s'est concentrée sur la récolte des parties aériennes des plantes. Chez les saules, les branches ont été coupées au ras de la bouture et cette dernière n'a pas été récoltée. Chez les herbacées, toutes les parties aériennes du pot ont été coupées au ras du sol. Chaque partie aérienne a été pesée pour son poids frais et placée dans un sac en papier identifié. Dans la deuxième étape, un échantillon de sol au niveau de la rhizosphère a été prélevé pour chaque pot et placé dans un sac plastique refermable identifiée (t1).

Préparation des échantillons

Séchage et pesée

Les parties aériennes ont été mises à sécher pendant 48 heures à 70°C dans des fours. Par la suite, leur poids sec a été mesuré à l'aide d'une balance de précision au 0,1 g près. Les racines et les échantillons de sols ont été séchés à l'air ambiant dans un laboratoire pendant plusieurs semaines.

Broyage des parties aériennes

Une fois sèches et pesées, les parties aériennes des plantes, ont été broyées en totalité à l'aide d'un broyeur « Thomas-WILEY Laboratory Mill » équipé d'une grille ayant un maillage de 2 mm. Les parties broyées ont été ensuite placées dans des sachets en plastique hermétiques identifiés. Chez les 60 plantes tirées au sort, au moins 10 g des parties aériennes broyées a été re-broyée en fines particules à l'aide d'un autre broyeur « Thomas-WILEY mini Mill », cette fois équipé d'une grille possédant des mailles de numéro 40 (équivalent à 0.8 mm d'écartement). Les parties aériennes finement broyées ont été placées dans de nouveaux sachets en plastique hermétiques identifiés et mises de côté pour l'analyse de leur contenu en zinc. Après le broyage de chaque échantillon, un lavage des broyeurs et des grilles a été réalisé à l'aide d'un jet d'air comprimé, de brosses ainsi que d'alcool afin d'éviter toute contamination entre les échantillons.

Tamissage des échantillons de sol

Une fois les échantillons de sol secs, 60 échantillons ont été tirés au sort et ont été tamisés à l'aide d'un tamis ayant un maillage de 500 μm . Les échantillons tamisés ont été placés dans des sacs sachets en plastique hermétiques identifiés, et mis de côté pour l'analyse de leur contenu en zinc (total et biodisponible).

Analyse des contenus en zinc et arsenic

Les contenus en éléments traces ont été déterminés à partir des protocoles de Cloutier-Hurteau et al. (2014) et Courchesne et al. (2017).

Préparation des échantillons pour l'analyse du contenu total en zinc et en arsenic

Pour réaliser ces analyses, 0,2 g d'échantillons finement broyé (pour les parties aériennes) ou tamisés (pour les sols) ont été placés dans un tube de digestion en borosilicate. Par la suite, 2 ml d'acide nitrique concentré (HNO_3 qualité métaux trace TMG) ont été ajoutés. Les échantillons ont passé une nuit entière dans l'acide nitrique. Le lendemain, ils ont été digérés pendant cinq heures sur des plaques chauffantes à 120°C , avec agitation toutes les 30 minutes pendant les trois premières heures. À la fin de la digestion et une fois les échantillons refroidis, le contenu des tubes a été transféré dans des tubes de type « Falcon » de 50 ml, qui ont été remplis jusqu'à 50 ml en complétant avec de l'eau ultra pure (MilliQ). Les échantillons ont été brassés, puis laissés au repos pendant une nuit.

Le lendemain, les échantillons ont été filtrés à l'aide de seringues au travers de filtres en ligne de nylon dotés de pores de $0,45\ \mu\text{m}$. Le filtrat obtenu pour chaque échantillon a été placé dans un nouveau tube de type « Falcon » de 50 ml. Enfin, les échantillons ont été dilués, dix fois pour les échantillons issus du sol et quatre fois pour les échantillons réalisés à partir de tissus végétaux. Un volume final de 5 ml de solution diluée a été obtenu et placé dans un tube de type « Falcon » de 15 ml.

Préparation des échantillons pour analyse du contenu biodisponible en zinc et arsenic (sol seulement)

La fraction des éléments traces solubles dans l'eau a été utilisée pour estimer les contenus en ET biodisponibles. Pour cette préparation, quatre grammes d'échantillon de sol tamisé ont été pesés et placés dans des tubes de type « Falcon » de 50 ml. Les tubes ont été par la suite remplis de 40 ml d'eau ultra pure (MilliQ). Ils ont ensuite été placés sur un brasseur automatique à basse vitesse pour une durée de deux heures, puis centrifugés à 1400 g pendant 15 minutes.

À la sortie de la centrifugeuse, un aliquot de la solution non filtrée a été prélevée pour l'analyse de la conductance et du pH. Le reste de la solution a été filtré à l'aide d'un système sous vide à travers d'une membrane de nylon dotée d'une ouverture de 0,45 μm . La partie filtrée a été récupérée dans un tube de type « Falcon » de 50 ml. Dix ml de la solution filtrée ont été versés dans des tubes de type « Falcon » de 15 ml, dans lesquels on a ajouté 0,04 ml de HNO_3 50% (v/v) afin d'acidifier la solution.

Mesure de pH

À partir de l'échantillon mis de côté lors de la préparation des échantillons pour analyse du contenu biodisponible, des mesures de pH et de conductance ont été réalisées à l'aide de d'un pH-mètre/conductimètre modèle Orion Star 215 de la marque Thermo Scientific. La sonde de pH a été calibrée à l'aide de trois solutions tampons de pH 4, 7 et 10 fournies par le fabricant. Pour la sonde de conductance, la calibration a été réalisée à l'aide d'une solution tampon à 12.9 mS cm^{-1} . Une mesure de pH et de conductance a été effectuée sur chaque échantillon. Entre deux mesures, les sondes ont été rincées avec de l'eau ultra pure et l'excédent d'eau retiré à l'aide d'essuyeurs « Kimwipe ».

Analyse du contenu en zinc et arsenic par ICP-MS

L'analyse du contenu en zinc, total et biodisponible a été réalisée par spectrométrie de masse à plasma (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) au laboratoire de chimie analytique de l'Université de Montréal.

Analyses statistiques

Comme trois de nos échantillons de sols au t0 étaient manquant, les données ont été extrapolées à l'aide du package R MICE (Multivariate Imputation by Chained Equations, <http://multiple-imputation.com>). Les réglages de bases ont été utilisés (5 imputations) pour générer trois concentrations de sol pour l'arsenic et le zinc à partir de tous les autres échantillons de sol (t0) présents. La quantité de métal extrait par les plantes (mg) est la quantité de zinc ou arsenic extrait du sol et accumulée dans la biomasse aérienne. Elle a été calculée en multipliant la biomasse aérienne sèche (convertie en kg) par la concentration en métal (zinc ou arsenic) accumulée dans cette biomasse (mg kg^{-1}).

Pour déterminer les effets des espèces et de l'agent chélateur, une ANOVA à deux facteurs croisés en utilisant le logiciel JMP 9.0 a été réalisée. Un test *post-hoc* a été employé sur chaque ANOVA présentant au moins un résultat significatif. Pour déterminer la différence entre les espèces, un test HSD de Tukey a été réalisé et, entre les traitements, un test t a été employé. Lors des test ANOVA pour les concentrations de métaux dans les parties aériennes et les extractions de métaux, des transformations log ont été utilisées pour satisfaire la condition d'homoscédasticité. Pour analyser les métaux totaux et biodisponibles du sol, un analyse différentielle t0-t1 a été effectuée à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs croisés. Pour évaluer

la variation de quantité de métaux du sol après l'expérience, un test de Dunnett a été employé sur l'analyse différentielle t0-t1.

Improved phytoextraction of zinc and arsenic by addition of the chelating agent NTA

Alexandre Licinio, Nicholas JBB Brereton, Cédric Frenette Dussault, Michel Labrecque, Frederic E. Pitre.

Address: Institut de recherche en biologie végétale, Université de Montréal, Jardin botanique de Montréal, Montréal, Canada.

Article en préparation pour soumission dans une revue avec comité de lecture.

Abstract

Trace element pollution in soil poses a threat to natural ecosystems worldwide. Novel approaches such as phytoremediation represent inexpensive and environmentally friendly alternatives. However, for phytoremediation to be competitive, greater knowledge about plant, soil and contaminant interactions is required. We evaluated the phytoextraction potential of two species of *Salix*, *Salix purpurea* and *Salix miyabeana*, two grasses, *Medicago sativa* and *Festuca arundinacea*, and one plant mix (Indigo mix) in a soil moderately contaminated with arsenic and zinc. Chelator NTA was added in small doses at regular intervals during plant growth. Both *Salix* species extracted the highest levels of Zn, with over 100% more than in best-performing grass species. Grasses such as *Festuca arundinacea* and Indigo mix, accumulated 100 to 200% more As than *Salix*. With NTA, phytoextraction of Zn increased by an additional 35% for *S. purpurea* and *F. arundinacea*. While Zn was successfully phytoextracted, this was not the case for As. Increased phytoextraction yield with NTA use was linked to an increase in above-ground biomass, which provided more storage space for Zn, but not for As. Overall, diminutions were observed for total Zn and As in soil but was mostly the result of leaching. However, with NTA applied, soil soluble Zn and As increased for willows but not for grasses, which demonstrates a difference in soil dynamics between shrubs and grasses in the presence of NTA. Our findings confirm that willows have a strong potential for phytoremediation of Zn contaminated soil by phytoextraction, which can be improved with little NTA.

Keywords

Phytoremediation, phytoextraction, NTA, zinc, arsenic, willows

Highlight

- *Salix purpurea* cv 'Fish Creek' performed best for zinc phytoextraction
- Arsenic phytoextraction was insignificant
- NTA increased biomass production which increased phytoextraction yields for zinc

Introduction

Ordinary industrial activities such as metal mining and milling are major sources of environmental pollution (Kabir et al., 2012; Wuana & Okieimen, 2011), with industrial accidents and negligence constituting other common contributors (Cloutier et al., 1993). The spillage of industrial products such as chemicals and trace elements (metal) is a salient example of an event that can cause a sudden increase in soil contamination (Clemente et al., 2003; Wang et al., 2003). To address these type of situations, conventional decontamination methods, which involve a physical decontamination process like soil replacement, soil spading, thermal desorption or vitrification, can be used (USEPA, 2007). These methods can include chemical decontamination using chelating agents, to leach contaminants, as well as amendments, to immobilize contaminants (Boisson et al., 1999; Peters, 1999). Such procedures often rely on heavy machinery and ex-situ treatment of the polluted soil, which alter the soil's natural characteristics and inflate decontamination costs as much as hundreds of thousands of dollars per hectare (Witters et al., 2012; Yao et al., 2012).

Since the late 1990s, a cheaper alternative, phytoremediation, has gained popularity in the scientific community and is now used commercially (Paz-Alberto, 2013). Defined as the use of plants and their microorganisms for the remediation of environmental pollution (Pilon-Smits, 2005), phytoremediation has shown promising results. This cost effective alternative respects and preserves the natural characteristics of the soil (Shakoor et al., 2013), and can also be used as a complement to conventional remediation (Pilon-Smits, 2005).

Among the different phytoremediation methods available, some target the large family of organic contaminants, for example, phytodegradation, which involves the enzymatic breakdown of pollutants present within the plant; phytostimulation, the degradation of pollutants by microbes present in the plant's rhizosphere; and phytovolatilisation, the release

of contaminants into the atmosphere in a volatile form. However, these methods are ineffective for contamination of inorganic pollutants such as trace elements (TE), for which two main methods have shown success. Phytostabilization sequesters the contaminant within plant roots or soil in a non-bioavailable form. Phytoextraction absorbs, translocates, and accumulates inorganic contaminants such as TE in the aerial biomass of plants, allowing their easy removal through harvesting (Pilon-Smits, 2005).

Plants used specifically for phytoextraction must possess several characteristics to be effective: fast growth, high biomass, high tolerance to important concentrations of contaminants and an affinity for the targeted contaminants that allows absorption and translocation into their aerial biomass (Sheoran et al., 2016).

Several species have shown potential for phytoremediation of TE. Shrub species of willow, *Salix purpurea* and *Salix miyabeana*, were successfully used to phytoextract inorganic contaminants such as Cd and Zn, and are known to sequester other contaminants, including As and Pb, in their roots (Constantineau, 2014; Desjardins et al., 2016). The herbaceous species *Medicago sativa* and *Festuca arundinacea* were also used with relative success in the phytoremediation of heavy metals such as Zn (Agnello et al., 2016; Bryson & Barker, 2007).

Soil amendments can be used to improve phytoextraction efficiency. For instance, chelating agents are chemical substances that increase solubility of soil metals, making them more available for plants to absorb (Farid et al., 2013; Wenzel et al., 2003). Some chelating agents, like EDTA, have been shown to constitute potential environmental pollutants themselves, able to negatively impact soil microbial fauna and promote leaching of metals (Shahid et al., 2013; Wenzel et al., 2003). However, the chelator nitrilotriacetic acid (NTA) is relatively efficient for Zn phytoextraction (Kayser et al., 2000; Kulli et al., 1999), rapidly biodegraded in soils, with a half-life of 3 to 5 days (Tiedje & Mason, 1974), less persistent in the environment and therefore potentially less harmful (Meers et al., 2004).

In this study, we evaluated the potential of phytoextraction for a contaminated soil in Zn and As with a pot experiment. The soil directly originated from a contaminated site in Saint-Octave-de-Métis (QC). Chosen plants species for the phytoextractions were two willows species, two herbaceous species and a plant mix. Chelator NTA was also added in half the pots.

After three months of growth, aerial biomass and concentration of Zn and As in the aerial biomass of selected plants were measured and compared to assess which of the species, with or without the application of NTA, performed best in phytoextraction. Soil Zn and As concentrations before and after the experiment were compared to evaluate phytoremediation efficiency.

Material and Methods

Experimental design

A pot experiment was set up in a growth tunnel next to Louis Dupire's greenhouses, on the grounds of the Montreal Botanical Garden. The experimental design consisted of 120 pots divided into 5 blocks. In each block, half the pots were treated with a chelating agent dissolved in distilled water while the other half was treated with distilled water alone. Also in each block, there was two replicates of each species-treatment combination; four species and one plant mix were tested, with a sixth category consisting of a control (no plant in pot).

Nitrilotriacetic acid (NTA) in the form of trisodium nitrilotriacetate was chosen as the chelating agent for its high solubility in water. NTA was added during the growth of the plants, the first application 30 days after plantation in a concentration of 2 mmol of NTA per kilogram of soil. Each pot contained 8 kg of soil; 16 mmol of trisodium NTA diluted in 50ml of distilled water were poured evenly over the entire surface of each pot. Pots that did not receive the chelating agent were given 50 ml of tap water instead.

Species

Four different species and one plant mix were selected to assess phytoremediation potential in this experiment: two willow species (*Salix purpurea* 'Fish Creek' and *Salix miyabenana* 'SX67'), two grasses (*Medicago sativa* and *Festuca arundinacea*) and one grass mix ("Indigo mix": a commercial mix including *Festuca rubra*, *Poa pratensis*, *Panicum virgatum*, *Andropogon gerardii*, *Avena sativa*, *Deschampsia cespitosa*, *Elymus Canadensis*, *Lolium multiflorum*, *Elymus trachycaulus* and *Spartina pectinata*). For the willow shrubs, cuttings bought from Agro Énergie (<http://agroenergie.ca/>) were planted in pots, while the grass species were sown directly in pots using seeds from Gloco (<http://www.gloco.ca/>) for *Festuca*,

Coop Fédérée (<http://lacoop.coop/>) for *Medicago* and Horticulture Indigo (<http://www.horticulture-indigo.com/>) for the Indigo mix.

Soil

Soil was brought from moderately contaminated areas of a concentrated zinc spill caused by a train derailment in Saint-Octave-De-Métis (QC, Canada) in 2004. The characteristics of the contaminated soil are depicted in Table 1. The soil was delivered to the experimental site as homogenized as possible, and put into 8L pots (ELITE 1000). To prevent leaching of the contaminant, each pot was lined with a plastic bag.

Sample preparation and monitoring of the experiment

The experiment was performed during the summer of 2015 and lasted for 3 months, after which the above-ground biomass of the plants was harvested. For the willows, branches were removed off the cutting. The cutting itself was not included in the aerial biomass. As for the grasses, all the above-ground parts were cut and kept. The fresh aerial parts were oven dried for 48 hours at 70°C and weighed again to determine dry biomass. The aerial parts were then ground a first time (leaves and twigs together) using a Thomas-WILEY Laboratory Mill equipped with a 2mm sieve. For trace element content analysis, 30 to 50% of the ground aerial parts was ground a second time using a Thomas-WILEY mini Mill equipped with a 0.8 mm sieve.

Soil samples were also collected, dried at room temperature and then sieved with a 0.5 mm sieve.

For analysis of total metal content of soil and plants, we used the methodology employed by Cloutier-Hurteau et al. (2014) and Courchesne et al. (2017), which is based on the hot acid-extractable method (Wilson et al., 2005).

For soluble-metal content in soil, 4 g of soil was weighed and placed into a 50ml conical centrifuge tube which was then filled with 40 ml of ultrapure water. The samples were shaken using a gyrotory shaker (New Brunswick Scientific CO, Gyrotory Shaker-model G2) for 2 hours. Subsequently, tubes were centrifuged at 1400g for 15 min. At this point, 5ml of the supernatant was used for pH analysis. The rest was filtered using a 0.45 μ m nylon filter membrane. The filtrate was then acidified with 0.04ml of HNO₃ 50% (v/v). The Zn and As concentrations of the samples were determined using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICPMS, Perkin Elmer NexION 300x).

Statistics

The extraction yield was used to determine how much Zn was extracted and accumulated by the plants in each pot. To calculate the phytoextraction yield, biomass (converted in kg) was multiplied by concentration of Zn or As in aerial parts (mg kg⁻¹). Because three of our initial (t₀) soil samples were missing, we used the MICE R package (Multivariate Imputation by Chained Equations, <http://multiple-imputation.com>) to complete the missing data. Default settings were used (5 imputations) to generate three soil concentrations for As and Zn from the existing soil samples. To assess the effects of chelating agent and species on Zn and As accumulation and extraction, a two-way crossed ANOVA was used with JMP 9.0 software. A posthoc test was used with significant ANOVA results. For discernment within each species, a Tukey test was chosen; between treatments, a t-test was used. For the ANOVA of aerial concentration and extraction yields for Zn and As, log transformations were used to handle the normality assumption. For total and bio-available metal content (Zn and As) in soil, a differential analysis of t₀ (before the experiment) and t₁ (after the experiment) was conducted using a two-way crossed ANOVA. A Dunnett's test was performed on the differential analysis to properly assess causes of soil metal variation after the experiment.

Results

Differences between species

Above-ground biomass

Significant difference in above-ground biomass was observed between species cultivated in the Zn and As contaminated soil (Figure 4). *Salix purpurea* had the highest dry above ground biomass, with 31.8 g dry matter (DM), followed by *Medicago sativa* with 29.9 g, *Salix miyabeana* with 25.3 g, Indigo mix with 24.2 g and *Festuca arundinacea* with 19.4 g (Figure 4).

Above-ground tissue metal concentration

In Zn contaminated soils, the two *Salix* species had the highest concentration in their above ground biomass, *S. miyabeana* with 760 mg Zn kg⁻¹ DM and *S. purpurea* with 610 mg Zn kg⁻¹, 20% less than *S. miyabeana* (Figure 5A). The willows had more than double the concentration found in the grasses. *M. sativa* had a concentration of 263 mg kg⁻¹, 65% less than *S. miyabeana*. Indigo mix had 179 mg kg⁻¹ (76% less than *S. miyabeana*) and *F. arundinacea* 120 mg kg⁻¹ (84% less than *S. miyabeana*)

Although concentrations were in general 1000x lower in above-ground tissues for As, a different pattern was observed. Each of the grasses had higher As concentrations in tissues than the *Salix* species, up to 200% more. *F. arundinacea* had the highest concentration, with 173 μ g As kg⁻¹ DM, followed by Indigo mix with 156 μ g As kg⁻¹ DM and *M. sativa* with 86 μ g As kg⁻¹ DM (figure 5B). Willows only reached concentrations of 61 μ g As kg⁻¹ DM in *S. miyabeana* and 32 μ g As kg⁻¹ DM in *S. purpurea*.

Total metal extraction

Both willows extracted over 100% more Zn than grasses. *S. purpurea* led the way with 19.40 mg, closely followed by *S. miyabeana* with 19.07 mg (Figure 6A). Herbaceous plants such as *M. sativa* only extracted 7.82 mg of Zn, Indigo mix 4.31 mg and *F. arundinacea* the least, with 2.31 mg.

Grasses extracted 100% more As than willows, with Indigo mix leading the way with 0.0038 mg, followed by *F. arundinacea* with 3.3 μ g and *M. sativa* with 2.5 μ g. The *S. miyabeana* willow extracted 1.5 μ g of As, and *S. purpurea* 1.0 μ g (Figure 6B).

Chelator NTA effect on plant growth and extraction

Above-ground biomass

NTA application led to a significant (ANOVA, $p < 0.0001$) and substantial increase in above ground biomass for *F. arundinacea*, with 23.8 g DM, a 22% increase, *S. purpurea* with 38.3 g DM, a 20% increase, and *S. miyabeana* with 29.6 g, a 17% increase (Figure 7). For Indigo mix and *M. sativa*, NTA did not significantly (ANOVA, $p > 0.05$) affect biomass.

Metal concentration

NTA had a significant effect on the zinc concentration in above-ground biomass of Indigo mix (T-test, $p = 0.0364$), with 216 mg kg^{-1} , a 20% increase, and *S. miyabeana* (T-test, $p = 0.0117$) with 604 mg kg^{-1} , a 20% decrease. However, NTA did not significantly alter Zn concentration in the other species.

NTA had a significant effect (T-test, $p = 0.0364$) on the arsenic concentration in above-ground biomass of Indigo mix, with 278 μ g kg^{-1} , a 77% increase. However, NTA did not significantly (T-test, $p > 0.05$) increase or decrease As concentration in the other species.

Total metal extraction

Zn extraction yield was significantly increased by NTA for 3 species. *S. purpurea* (T-test, $p = 0.0285$) experienced an 35% increase, to 26.2 mg of Zn extracted. *F. arundinacea* (T-test, $p = 0.219$) extracted 3.1 mg of Zn, also a 35% increase. Indigo mix (T-test, $p = 0.0184$) extracted 5.35 mg of Zn, a 24% increase (Figure 7). No significant effect (T-test, $p > 0.05$) of NTA was observed for *M. sativa* or *S. miyabeana* for Zn extraction.

NTA had no significant effect on As extraction yield in all but one specie. *S. purpurea* had a significant (T-test, $p = 0.0372$) increase in As extracted, with 1.7 μg of As, an increase of 62%.

Soil metals

Total metal concentration in soil

After the experiment, a general tendency toward a decrease in total Zn concentration in soil was observed (Table 3).

A t0-t1 differential analysis testing the changes in total metal concentration showed no significant effect of plant species or NTA on total Zn concentration, but a significant interaction was found (ANOVA, $p=0.0211$). Dunnett's test, comparing the planted soils to the unplanted control soils, was not significant for all pots, with or without NTA (Dunnett's, $p>0.05$).

For total As concentration in soil, a general tendency toward a decrease in concentration was also observed after the experiment (Table 3).

A t0-t1 differential analysis showed no significant effect of plant species or NTA, and no interaction on the total As soil concentration (ANOVA, $p>0.05$). Dunnett's test showed a significant difference in soil total metal content for one plant, *M. sativa* under NTA treatment (Dunnett's, $p=0.0401$), but was not significant for the other plants ($p>0.05$).

Soluble metal concentration in soil

Overall, there was a general tendency toward a decrease in Zn soluble concentration in soil after the experiment (Table 4).

A t0-t1 differential analysis showed a significant effect of the species (ANOVA, $p < 0.0001$), NTA ($p = 0.0222$) and their interaction ($p = 0.0006$) on the concentration in soil.

Without NTA, Dunnett's test showed significant differences between the control pot and Indigo mix (Dunnett's, $p < 0.0001$), *F. arundinacea* ($p = 0.0003$), *M. sativa* ($p = 0.0195$) and *S. miyabeana* ($p = 0.0323$). *S. purpurea* was not significantly different ($p > 0.05$). With NTA, Dunnett's test showed significant differences between the control and *S. purpurea* ($p = 0.0015$) and *S. miyabeana* ($p < 0.0001$). The other species were not significantly different ($p > 0.05$).

For soluble As concentration in soil, there was no tendency toward a decrease or an increase in concentration after the experiment (Table 4).

However, a t0-t1 differential analysis showed a significant effect of the species (ANOVA, $p < 0.0001$), although not of NTA ($p > 0.05$). Their interaction was also significant ($p = 0.0265$).

Without NTA, Dunnett's test showed a significant difference between the control pot and *F. arundinacea* ($p < 0.0001$). The other species were not significantly different ($p > 0.05$). With NTA, Dunnett's test showed significant differences between the control and Indigo mix ($p = 0.0030$). The other species were not significantly different ($p > 0.05$).

Discussion

Differences between species

Here, we evaluated the success of phytoextraction of zinc and arsenic by different plant species and in combination with/without a chelating agent through a greenhouse pot experiment.

Above ground biomass

A higher biomass yield was expected from woody (*Salix spp*) compared to herbaceous (*F. arundinacea*, *M. sativa* and Indigo mix) species (Guidi Nissim et al., 2013), but *M. sativa* produced slightly more aerial biomass than *S. miyabeana*, although less than *S. purpurea*. Our results concur with those of Desjardins et al. (2016), who also reported a high aerial biomass yield for *M. Sativa* during phytoremediation of a Zn, Cu and Ag contaminated soil.

Above ground tissue concentration

The accumulation of zinc in above-ground biomass was greater in the two *Salix* species, *S. purpurea* and *S. miyabeana*, with 2 to 3 times more Zn accumulated than in the best performing herbaceous plant, *M. sativa*. Willows are well known to tolerate and accumulate large quantities of Zn in their aerial parts (Meers & Vandecasteele, 2007), while herbaceous species tend to have a high tolerance to ET contamination, but a lower phytoextraction capacity (Agnello et al., 2016; Chekol & Vough, 2001; Yang et al., 2008). An important part of phytoremediation by phytoextraction is the yield and successive harvest of the aerial parts of specialized species over repeated growth cycles (Dickinson & Pulford, 2005; Van Slycken et al., 2013). In this regard, willows are of particular interest because they tolerate coppicing very well, allowing a complete harvest of their aerial parts without compromising their productivity (McBride et al., 2016).

For arsenic, we observed that the grasses accumulated two to five times more than the willows. However, this accumulation of As in aerial biomass seems very limited, and insignificant when compared to known As hyperaccumulators such as *Pteris vittata*, *P. oshimensis* and *P. multifida*, which can amass a few hundred to thousands of mg kg⁻¹ of As (Danh et al., 2014; Wang et al., 2006).

Total metal extraction

Combining above-ground biomass production and zinc accumulation provides an estimate of the performance of willows for Zn extraction. Willows are well suited for Zn extraction due to their high aerial biomass and capacity to accumulate Zn in high quantity within their tissues (McBride et al., 2016). Herbaceous plants are often less effective for phytoextraction, mainly because of their inferior biomass (except for *M. sativa* in our case) and a tendency to concentrate lower level of Zn in their aerial biomass (Agnello et al., 2016; Yang et al., 2008; Zamani et al., 2015). The findings here do not show success in extracting arsenic. Previous studies that used willows for phytoextraction on TE contaminated soils that included As had similar results, with very little translocation and accumulation of As in their aerial biomass (Tangahu et al., 2011; Vamerali et al., 2009).

Chelator effect on plant growth and metal extraction

Above ground biomass

NTA application led to a significant increase in biomass for both willows and *F. arundinacea*. It is known that the higher the dose of chelator, the higher the potential for plant intoxication by elements made soluble by the chelator and the chelator itself, which inhibit plant growth, or even cause plant death (Evangelou et al., 2007; Kulli et al., 1999). In this case, the chelating treatment was spread over eight applications, every five days. This may have allowed some of the NTA to partially biodegrade, lowering its effect (Meers et al., 2005). It is

possible that the quantity of NTA applied in this experiment had a positive effect on plant growth and biomass, by making additional nutritive elements from the soil available without poisoning the plants. The low dose of NTA combined with low TE contamination in the soil are important points to note in regard to these suppositions, making a harmful effect of the chelator unlikely (Alkorta et al., 2004).

Metal concentration

While NTA has a strong affinity for zinc (Meers et al., 2005), we observed an absence of NTA effect on Zn accumulation in our plants. It is possible that plant tissues were already Zn saturated, and could not take up any more, without being intoxicated (Nagajyoti et al., 2010). The average measured concentrations of Zn in tissues were similar to those found in the literature (Cloutier-Hurteau et al., 2014; Guidi et al., 2012; Utmazian & Wenzel, 2007). This could explain why Zn concentration in tissue decreased in *S. miyabeana*, being already saturated.

For arsenic, NTA had almost no effect on concentration in tissue. However, Peñalosa et al. (2007) found that NTA was effective in solubilizing As and increasing tissue concentration in white lupin plants (*Lupus albus*). In this experiment, only one treatment, Indigo mix, had a significant increase in As concentration in its tissue. This could be explained by the low affinity the plant species used in the experiment have for As.

Total metal extraction

The chelator dose used in this experiment was very low (2 mmol of NTA per kilogram of soil), similar to that used by Kayser (2000) in a Zn phytoextraction experiment. However, another study by Meers et al. (2004) found that such a low dose of NTA might not be sufficient to have a significant effect on Zn phytoextraction. In the present study, while NTA had little to no effect on metal concentrations in biomass, it had a significant effect on above ground

biomass. This increase in biomass allowed the plants more storage space in which to accumulate Zn, thus increasing phytoextraction yield.

The same was observed for accumulation of arsenic in *S. purpurea*, which showed increased As phytoextraction yield via biomass increase, but no increase in As concentration in tissues. The yield was still vastly inferior to that of the other grasses used in this experiment, confirming that, indeed, arsenic is not well translocated and accumulated in willows (Tangahu et al., 2011; Vamerali et al., 2009).

Soil metals

Total metal concentration

While the levels of Zn and As were significantly lower after the phytoextraction experiment, it is impossible to link this decrease to the sole effect of phytoextraction. By means of the Dunnett's test, it was established that the decrease in total Zn concentration in soil was not the result of phytoextraction, but was caused by other factors, as the soil of the control pot exhibited the same decrease in Zn concentration. A similar assumption can be made for As, the concentration of which was not significantly different from that of the unplanted control pot in all pots but one.

There are two main factors likely to have caused the decrease in metal concentration in soil. Zn and As may have leached toward the bottom of the pots, which was not sampled (the core of the control pot was sampled, to mimic the sampling of rhizosphere soil sampled in planted pots). Alternatively, soil TE heterogeneity may have influenced decontamination results. It is difficult to control precisely for concentration of contaminants in soils that had been contaminated previously. Despite intense efforts to homogenize the soil during the preparation of the experiment, marked variations in soil characteristics remained between the pots, and possibly within the pots (Frouz et al., 2011; Li et al., 2010).

The experiment reported here was conducted over a single growing season. To obtain a major decrease in soil contamination by phytoextraction, a few growing seasons would be required, to harvest larger quantities of aerial biomass (Robinson et al., 2006; Vassilev et al., 2004).

Soluble metal concentration

The chelation treatment modified the bioavailability of the zinc but not of the arsenic. Much like total Zn, which includes soluble Zn, absorption and sequestration by plants only partly explain the decrease in soluble Zn. For the two willows studied here, *S. purpurea* and *S. miyabeana*, the behavior of soluble Zn in soil changes with the treatment applied. Without the chelating treatment, soluble Zn concentrations tended to diminish, while with a chelating treatment, soluble Zn concentrations increased. It is expected that a chelating agent will render soil elements more soluble (i.e. more available for the plants), so this result is not surprising. However, this was only true for the two willow species and not for the herbaceous species. A possible hypothesis to explain this observation is related to differences between the root systems of the plants tested. It is known that the roots of shrub species, such as willows, and grasses release different organic acids, and this could influence the dynamics of soil element solubility (Xuan et al., 2017).

Because arsenic was poorly absorbed by plants, its soluble concentration had barely changed in soil following the experiment.

Conclusion

The experiment reported here revealed that willows have great potential for the phytoextraction of zinc from moderately contaminated soils. Several coppicing cycles over a number of years should efficiently decrease soil Zn contamination. For arsenic, other plant species should be selected and evaluated for phytoextraction capability. Additionally, this experiment highlights that a small dose of chelating agent can provide a significant boost in phytoextraction of trace elements.

Tables and Figures

Tableau 2. Initial soil characteristics of the contaminated soil*

Soil texture	Loam
Clay (%)	24.2 ± 0.5
Silt (%)	37.8 ± 3.4
Sand (%)	39.5 ± 5.7
Organic matter (%)	5.7 ± 0.3
pH*	5.4 ± 0.1
CEC (meq 100g ⁻¹)	18.5 ± 0.5
Total nitrogen (g kg ⁻¹)	2.97 ± 0.06
Zn (mg kg ⁻¹)	420.9 ± 45.4
As (mg kg ⁻¹)	7.52 ± 0.3

*Means from three contaminated soil samples. pH was soil water pH.

Tableau 3. Total metal concentration comparisons before and after the experiment for each pot, by species and NTA treatment.

		<i>Salix purpurea</i>			<i>Salix miyabeana</i>			<i>Festuca arundinacea</i>		
No NTA		Soil concentration (mg kg ⁻¹)		<i>t-test</i>	Soil concentration (mg kg ⁻¹)		<i>t-test</i>	Soil concentration (mg kg ⁻¹)		<i>t-test</i>
Zn	t0	479.18	± 80.27	*	402.30	± 9.65	p=0.2422	430.11	± 15.45	***
	t1	383.65	± 26.37	p= 0.0353	389.50	± 20.51		368.27	± 8.15	p<0.0001
As	t0	7.69	± 0.13	*	7.48	± 0.25	p=0.9919	7.57	± 0.12	***
	t1	7.23	± 0.31	p=0.0156	7.48	± 0.17		7.07	± 0.17	p= 0.0007
NTA										
Zn	t0	397.36	± 14.16	p=0.8848	412.76	± 6.45	**	402.56	± 25.18	**
	t1	400.68	± 47.59		370.34	± 22.78	p=0.0039	360.47	± 9.99	p=0.0084
As	t0	7.54	± 0.36	p=0.9288	7.43	± 0.14	p=0.2400	7.37	± 0.07	**
	t1	7.52	± 0.34		7.15	± 0.46		6.85	± 0.34	p= 0.0099

		<i>Medicago sativa</i>			Indigo mix			Unplanted control		
No NTA		Soil concentration (mg kg ⁻¹)		<i>t</i> -test	Soil concentration (mg kg ⁻¹)		<i>t</i> -test	Soil concentration (mg kg ⁻¹)		<i>t</i> -test
Zn	t0	414.23	± 36.99	*	408.79	± 9.09	*	443.98	± 8.40	**
	t1	362.92	± 13.31	p=0.0193	380.34	± 16.91	p=0.0106	412.30	± 11.94	p=0.0049
As	t0	7.60	± 0.41	p=0.2578	7.36	± 0.26	p=0.3228	9.26	± 0.18	**
	t1	7.30	± 0.37		7.14	± 0.39		8.61	± 0.31	p=0.0035
NTA										
Zn	t0	445.90	± 84.89	p=0.4924	411.19	± 26.79	*	433.21	± 9.53	p=0.1343
	t1	404.29	± 97.58		374.15	± 16.12	p=0.0293	415.02	± 18.74	
As	t0	7.81	± 0.49	p=0.0601	7.31	± 0.18	p=0.1230	8.77	± 0.15	p=0.7293
	t1	7.19	± 0.41		7.05	± 0.28		8.83	± 0.25	

Each comparison is between t0 (before the experiment) and t1 (after the experiment).

Tableau 4. Soluble metal fraction of total metal concentration and comparisons of concentrations before and after the experiment for each pot, by species and NTA treatment.

		<i>Salix purpurea</i>				<i>Salix miyabeana</i>				<i>Festuca arundinacea</i>			
No NTA		Soil concentration (mg kg ⁻¹)		t-test	Fraction in soil(%)	Soil concentration (mg kg ⁻¹)		t-test	Fraction in soil(%)	Soil concentration (mg kg ⁻¹)		t-test	Fraction in soil(%)
	Zn	t0	1.47	± 0.11	**	0.31	1.56	± 0.08	***	0.39	1.56	± 0.10	* **
	t1	0.90	± 0.30	p=0.0047	0.23	1.02	± 0.10	p<0.0001	0.26	0.54	± 0.18	p<0.0001	0.15
As	t0	0.012	± 0.001	*	0.16	0.011	± 0.001	*	0.15	0.010	± 0.003	*	0.13
	t1	0.010	± 0.002	p=0.0329	0.14	0.009	± 0.002	p=0.0108	0.12	0.015	± 0.004	p=0.0286	0.22
NTA													
Zn	t0	1.49	± 0.17	*	0.38	1.50	± 0.14	*	0.36	1.51	± 0.07	**	0.38
	t1	2.08	± 0.47	p=0.0289	0.52	2.30	± 0.53	p= 0.0111	0.63	0.95	± 0.29	p=0.0032	0.27
As	t0	0.012	± 0.0004	p= 0.8252	0.16	0.010	± 0.001	p=0.1263	0.14	0.011	± 0.001	*	0.15
	t1	0.012	± 0.002		0.16	0.013	± 0.003		0.18	0.015	± 0.003	p=0.0247	0.22

		<i>Medicago sativa</i>				Indigo mix				Unplanted control			
No NTA		Soil concentration (mg kg ⁻¹)		t-test	Fraction in soil(%)	Soil concentration (mg kg ⁻¹)		t-test	Fraction in soil(%)	Soil concentration (mg kg ⁻¹)		t-test	Fraction in soil(%)
	Zn	t0	1.58	± 0.12	***	0.38	1.58	± 0.10	***	0.39	1.48	± 0.03	p=0.8400
	t1	0.90	± 0.18	p=0.0001	0.25	0.55	± 0.11	p<0.0001	0.14	1.42	± 0.64	0.35	
As	t0	0.013	± 0.001	*	0.17	0.012	± 0.0003	p=0.7475	0.16	0.010	± 0.0004	***	0.11
	t1	0.010	± 0.002	p=0.0442	0.14	0.012	± 0.003		0.16	0.007	± 0.001	p=0.0005	0.08
NTA													
Zn	t0	1.50	± 0.06	p=0.6344	0.34	1.55	± 0.04	***	0.38	1.48	± 0.08	**	0.34
	t1	1.40	± 0.48		0.34	1.02	± 0.18	p=0.0002	0.27	0.85	± 0.39	p=0.0075	0.20
As	t0	0.012	± 0.0004	p=0.8607	0.15	0.011	± 0.001	p=0.0549	0.16	0.010	± 0.0003	***	0.12
	t1	0.011	± 0.003		0.16	0.023	± 0.012		0.33	0.007	± 0.001	p=0.0008	0.08

Each comparison is between t0 (before the experiment) and t1 (after the experiment) between concentration and not fraction.

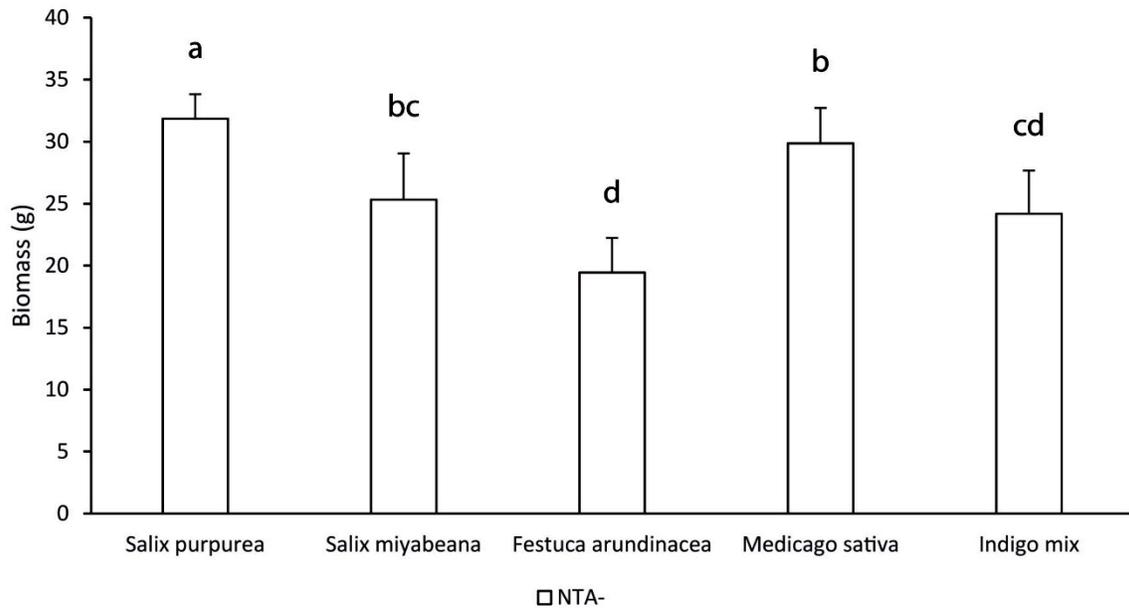


Figure 3. Dry above-ground biomass across all species, no chelator. Letter annotation indicates rank in the Tukey test ($\alpha = 0.05$).

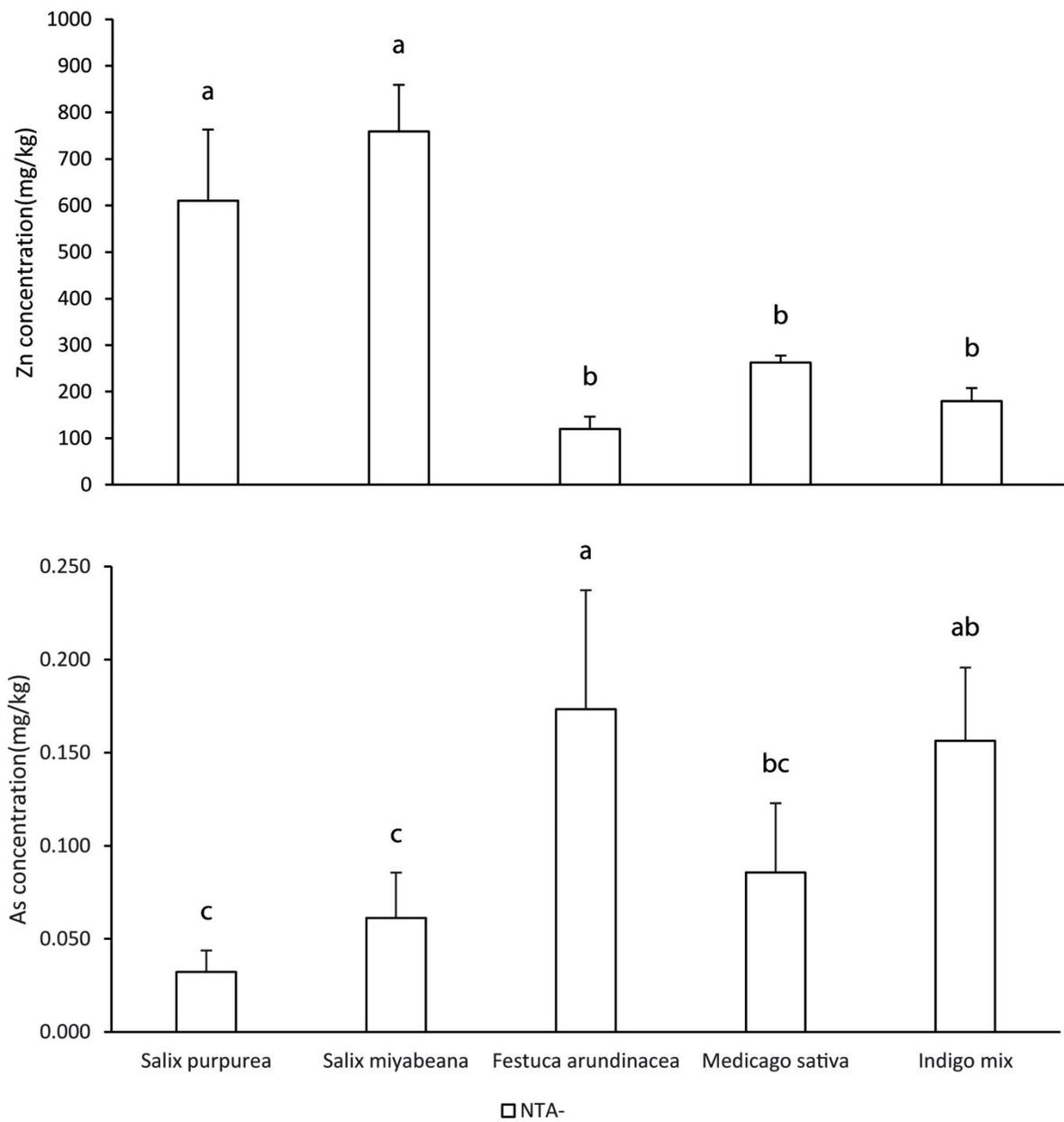


Figure 4. Metal concentration in above-ground biomass for all species, no chelator. **A** Zn concentration. **B** As concentration. Letter annotation indicates significant differences between means in the Tukey test ($\alpha = 0.05$).

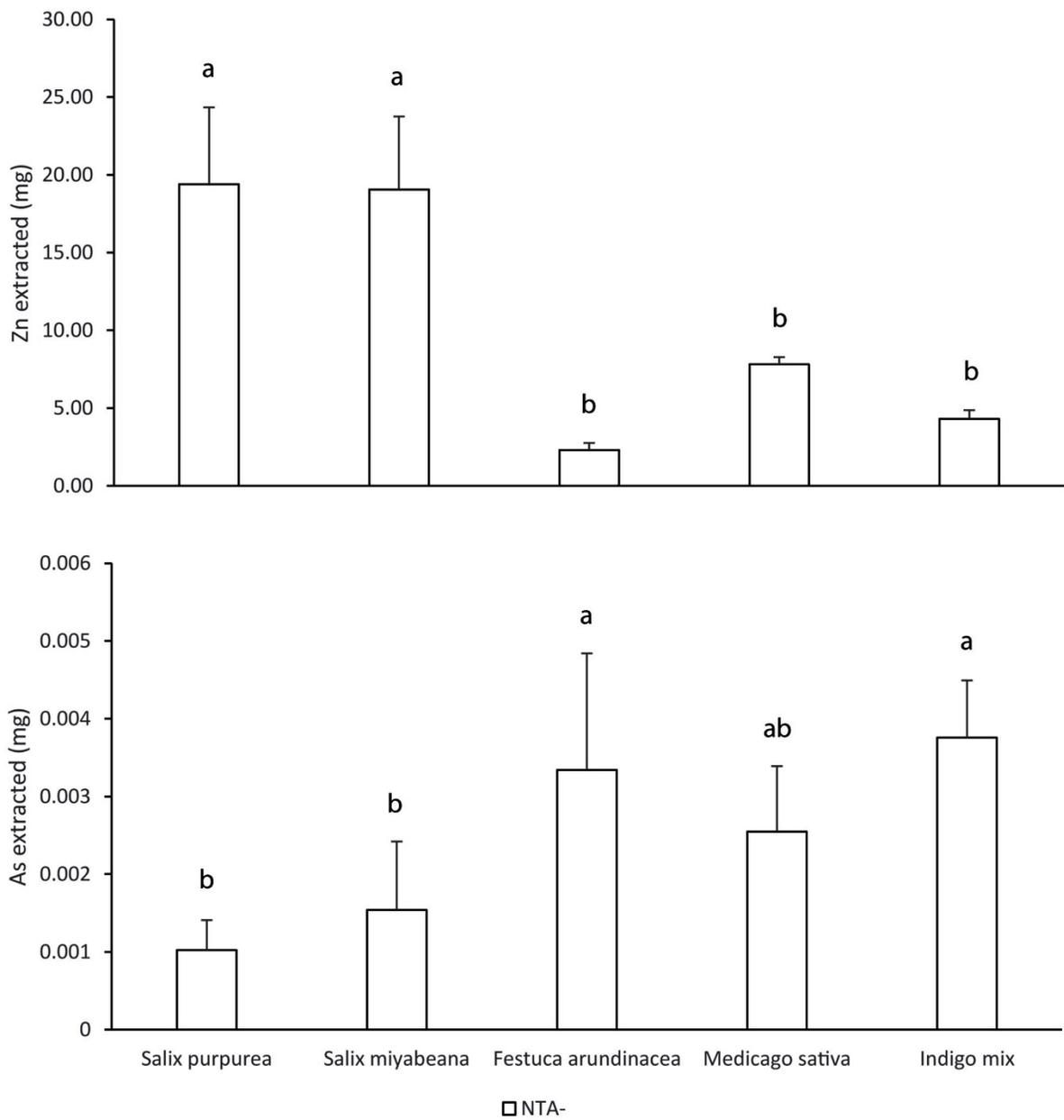


Figure 5. Metal extracted by all species, no chelator. **A** Zn extracted. **B** As extracted. Letter annotation indicates significant differences between means in the Tukey test ($\alpha = 0.05$).

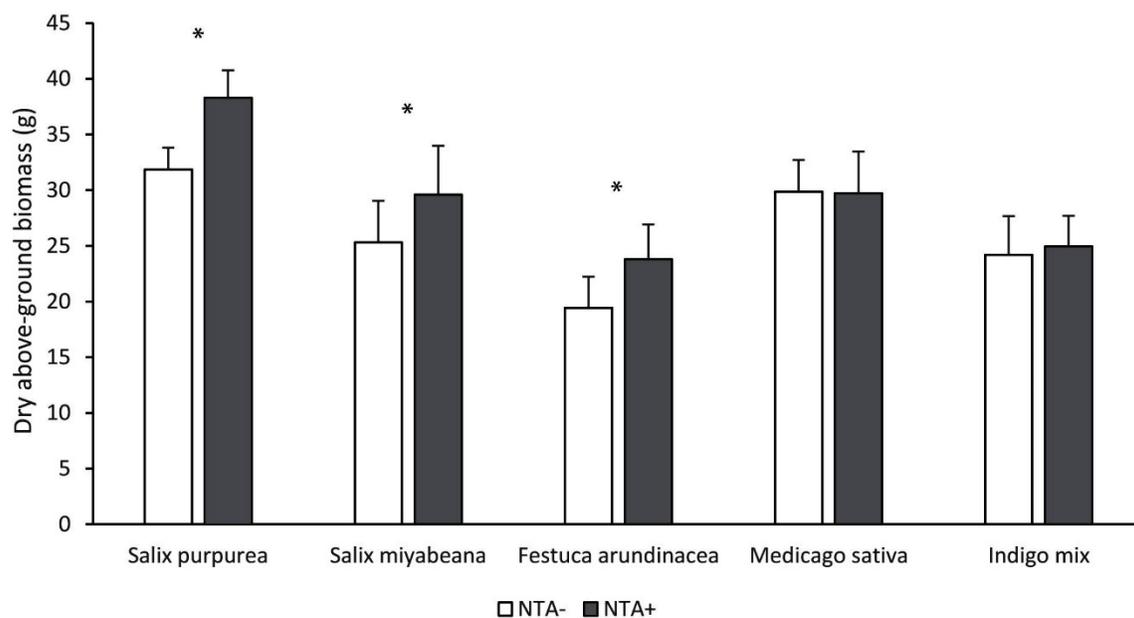


Figure 6. Effect of NTA on biomass for the five species. * indicates a significant effect of NTA.

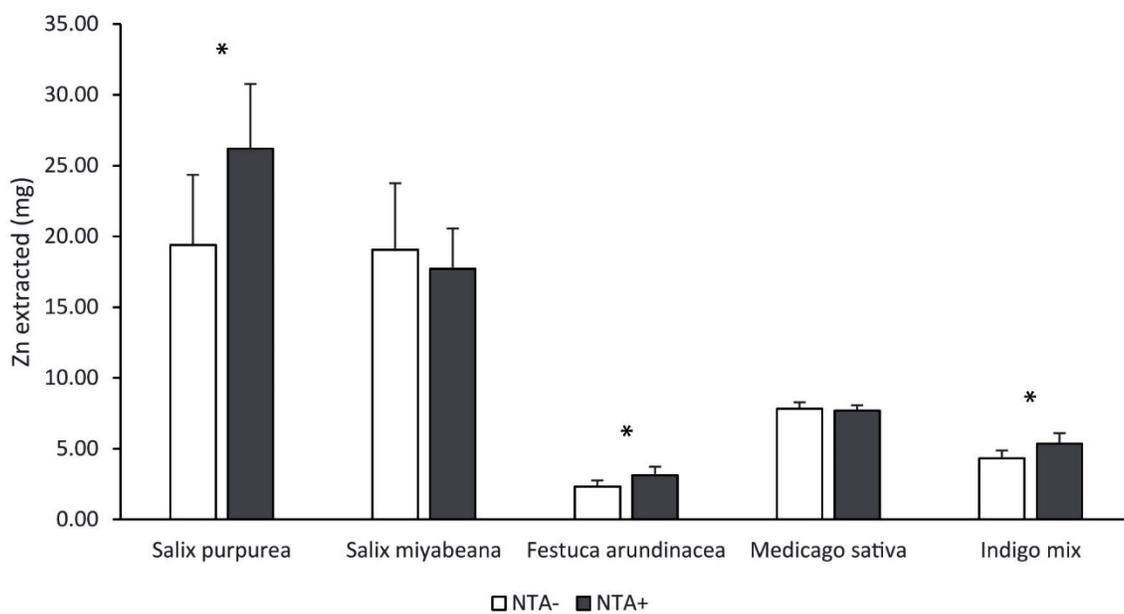


Figure 7. Effect of NTA on Zn extraction. * indicates a significant effect of NTA ($\alpha = 0.05$).

Conclusions générales et perspectives

Cette section présente les conclusions issues des résultats de l'expérience de phytoremédiation que j'ai menée dans le cadre de mon projet de maîtrise.

Retour sur les objectifs et hypothèses

Mon expérience de phytoremédiation avait pour but de sélectionner des plantes capables de réaliser la phyto-extraction d'un terrain modérément contaminé en zinc et en arsenic et d'évaluer leurs performances respectives. Ce projet a constitué une bonne introduction aux défis caractéristiques de la phytoremédiation.

Une décontamination efficace nécessite une étude approfondie de l'ensemble des facteurs affectant la phytoremédiation (Sheoran et al., 2016; Tangahu et al., 2011). Le processus de décontamination va bien au-delà de la simple plantation d'arbustes et d'herbacées. La sélection de plantes adaptées est une étape décisive. Non seulement la plante doit démontrer une affinité pour le ou les contaminants à phytoremédier, elle doit aussi pouvoir croître de façon optimale dans le sol et le climat du site à décontaminer. La sélection initiale des espèces végétales utilisées dans cette expérience a été effectuée grâce à des connaissances préliminaires sur leur efficacité en matière de phytoremédiation. Cette efficacité a été testée sur le sol en provenance de Saint-Octave-De-Métis afin de présenter une solution de phytoremédiation optimale, adaptée au site contaminé.

Le premier objectif de l'expérience s'appuyait sur l'hypothèse stipulant que les espèces végétales présentent des affinités différentes pour les contaminants présents et les accumulent de façon inégale. L'accumulation du contaminant en quantité importante dans les parties

aériennes est un facteur crucial en matière de phyto-extraction.(Dickinson et al., 2009; Pilon-Smits, 2005). Les espèces choisies étaient séparées en deux classes, les espèces ligneuses (arbustes) et non ligneuses (herbacées), ce qui a entraîné, dès le début de l'expérience, des différences morphologiques et physiologiques. Les résultats obtenus montrent que la phyto-extraction du zinc par les deux espèces de saules, *Salix purpurea* et *Salix miyabeana*, était efficace et similaire à celle observée dans la littérature (Cloutier-Hurteau et al., 2014; Guidi et al., 2012; Utmazian & Wenzel, 2007). Cette extraction était par contre bien moindre chez les herbacées sélectionnées, qui ne constituent donc pas de bons candidats pour la phyto-extraction du zinc.

Pour l'arsenic, bien que les plantes herbacées comme *Festuca arundinacea* et le mélange Indigo aient accumulé des quantités bien plus importantes dans leur parties aériennes, leurs performances de phyto-extraction sont restées vraiment bien en deçà de celles d'espèces végétales spécialisées dans la phyto-extraction de ce contaminant (Danh et al., 2014; Wang et al., 2006). Ainsi, parmi toutes les plantes sélectionnées pour le projet, aucune n'était efficace dans un contexte de phyto-extraction de l'arsenic. Ces résultats confirment la première hypothèse posée en démontrant que les espèces végétales sélectionnées pour cette expérience ont des affinités différentes pour le zinc et l'arsenic et les accumulent différemment.

Le second objectif de cette expérience portait sur l'évaluation d'un agent de chélation pour la phyto-extraction des contaminants. Selon la littérature, l'ajout d'un chélateur entraîne une augmentation significative de la phyto-extraction de métaux (Lestan et al., 2008). Un agent de chélation complexe rend plus solubles des éléments métalliques normalement peu solubles dans un sol (Alkorta et al., 2004; Farid et al., 2013). C'est sur cette caractéristique que se basait l'hypothèse relative à cet objectif. Dans mon expérience, le traitement de chélation a été calibré

de façon à être minimal tout en conservant un effet significatif sur la phyto-extraction (Kayser et al., 2000). De plus, toujours afin de réduire au maximum le stress que pouvait causer l'agent de chélation aux espèces végétales, j'ai divisé ce traitement en plusieurs applications. L'agent de chélation a bien augmenté la phyto-extraction pour certaines plantes, mais pas toujours de la façon attendue. Dans la littérature, l'action du chélateur augmente la solubilité des éléments traces et facilite ainsi leur absorption, ce qui mène à une augmentation de leur concentration dans la plante (Lestan et al., 2008). Dans cette expérience, ce mécanisme n'est observé que pour le mélange Indigo, aussi bien pour le zinc que pour l'arsenic. Pour les autres espèces, un mécanisme différent est observé. L'augmentation de la phyto-extraction chez les plantes concernées, soit *Salix purpurea* et *Festuca arundinacea*, est liée à l'augmentation de biomasse aérienne générée par le chélateur, et non à la concentration de métaux dans la biomasse aérienne, cette dernière restant plutôt inchangée. Cette augmentation de biomasse fournit un plus grand espace de stockage pour le zinc et l'arsenic, et permet donc d'augmenter la quantité de contaminants extraite tout en maintenant le taux de concentration de ces derniers dans les parties aériennes. Ces résultats soutiennent partiellement la seconde hypothèse qui stipulait que les concentrations de zinc et d'arsenic dans les plantes allaient augmenter à la suite de l'ajout d'un chélateur. Parmi toutes les plantes, seul le mélange Indigo a présenté ce résultat. Chez les autres espèces végétales, il n'y a pas eu d'augmentation dans les concentrations de contaminants accumulés.

Le troisième et dernier objectif de l'expérience était d'attester de la décontamination du sol, c'est-à-dire de démontrer une diminution de la concentration en zinc et en arsenic dans le sol à la suite de la phyto-extraction. Cet objectif était basé sur l'hypothèse suivante : si la phyto-extraction retire des contaminants du sol, une diminution des concentrations de zinc et d'arsenic

dans le sol est attendue. Cette approche logique était néanmoins difficilement vérifiable dans les trois mois qu'a duré la saison de croissance de cette expérience. En effet, pour que la phyto-extraction ait un effet conséquent sur la décontamination d'un sol, plusieurs années de croissance et de récoltes des parties aériennes contaminées sont nécessaires (Robinson et al., 2006; Vassilev et al., 2004). Les plantes, en effet, pour ne pas s'empoisonner et dépérir, sont limitées par leur physiologie et ne retirent et n'accumulent qu'une faible quantité de métal par saison de croissance (Broadley et al., 2007; Dickinson et al., 2009; Hettick et al., 2015). Bien que des diminutions dans les concentrations de zinc et d'arsenic aient été mesurées dans le sol des pots après l'expérience, les résultats recueillis ne permettent pas de soutenir l'hypothèse stipulant que la décontamination du sol provient de la phyto-extraction. Dans cette expérience, les diminutions de contamination mesurées dans les sols ne proviennent qu'en partie de la phyto-extraction. Des facteurs comme le lessivage des contaminants et leur variabilité au sein des sols ont un effet bien supérieur (Frouz et al., 2011; Li et al., 2010). La précision des analyses du sol serait donc limitée. L'efficacité de la phytoremédiation du zinc dans ce projet n'est cependant pas remise en question. En effet, les concentrations de contaminant retrouvées dans les parties aériennes attestent de leur extraction du sol et indiquent que la contamination a commencé à diminuer.

Recommandations et perspectives

Les résultats obtenus permettent de recommander la phytoremédiation du zinc sur le terrain contaminé situé à Saint-Octave-De-Métis. Cette phytoremédiation par phyto-extraction du zinc reposerait sur l'utilisation de saules, de préférence avec *Salix purpurea*, soutenus par l'ajout d'un traitement de chélation au NTA. Ces derniers seront cependant peu efficaces dans

la phyto-extraction de l'arsenic, qui est en général difficile à réaliser, car peu de plantes accumulent ce contaminant dans leurs parties aériennes. À ce jour, les seules espèces capables de l'accumuler efficacement sont des fougères du genre *Pteris*, qui sont non indigènes au Québec. Une nouvelle étude devrait être réalisée pour traiter plus spécifiquement de la contamination à l'arsenic sur le site de Saint-Octave-De-Métis. Des recherches sur le sujet seraient par ailleurs intéressantes pour l'ensemble des chercheurs qui s'intéressent à la décontamination des sols.

À travers le monde, la phytoremédiation se démarque déjà par des résultats prometteurs dans la décontamination de terrains contaminés et devient une alternative efficace et économique aux méthodes de décontaminations classiques (Lee, 2013; Sharma & Pandey, 2014). Cependant, à cause de la complexité des interactions entre sols, plantes et contaminants, des études sont encore nécessaires pour améliorer son potentiel et l'efficacité d'un facteur clé : le temps nécessaire à la décontamination (Lee, 2013; Pilon-Smits, 2005).

Les études empiriques comme ce projet de maîtrise donnent des résultats et des conclusions ciblées mais leurs applications restent grandement spécifiques à chaque cas de décontamination. L'avancée des recherches dans le domaine de la physiologie et de la génétique des plantes devraient permettre de mettre en place ou de perfectionner de nouvelles technologies de phytoremédiation. Ces dernières pourront concerner la création de plantes transgéniques spécialisées dans la décontamination des sols (Ikwuemesi & Uchendu, 2016) ou encore l'étude génomique approfondie du méta-organisme que forment les plantes et les organismes du sol (Bell et al., 2014). Ces nouvelles solutions pourront ensuite être liées à des expériences de phytoremédiation comme celle que j'ai menée.

Enfin, avec la mise en place de solutions de recyclage et de revalorisation des matières végétales contaminées provenant de la phytoremédiation, comme la fabrication de biocarburant et l'extraction de composés phénoliques (Brereton et al., 2017; Tripathi et al., 2016), la phytoremédiation se démarque comme la solution durable de décontamination des sols.

Bibliographie

- Agnello, A. C., Huguenot, D., van Hullebusch, E. D., & Esposito, G. (2016). Citric acid- and Tween(®) 80-assisted phytoremediation of a co-contaminated soil: alfalfa (*Medicago sativa* L.) performance and remediation potential. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(9), 9215–9226.
- Algreen, M., Trapp, S., & Rein, A. (2014). Phytoscreening and phytoextraction of heavy metals at Danish polluted sites using willow and poplar trees. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(15), 8992–9001.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*.
- Alkorta, I., Becerril, J., & Garbisu, C. (2010). Phytostabilization of metal contaminated soils. *Reviews on Environmental Health*.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J. M., Amezaga, I., Albizu, I., Onaindia, M., & Garbisu, C. (2004). Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *3*(1), 55–70.
- Alloway, B. et al. (2013). Zinc. In *Heavy Metals in Soils* (Vol. 22, pp. 465–493). Springer.
- Alvarenga, P., & Gonçalves, A. (2008). Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *Science of the Total Environment*, *406*(1–2), 43–56.

- Anderson, J. (1993). Selenium interactions in sulfur metabolism: Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants. *Regulatory Agricultural and Environmental Aspects SPB Academic Publishing*, 49–60.
- Baker, A. J. M., & Brooks, R. R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery.*, 1(2), 81–126.
- Barak, P., & Helmke, P. A. (1993). The chemistry of zinc. In *Zinc in soils and plants* (pp. 1–13). Springer.
- Batty, L., & Anslow, M. (2008). Effect of a polycyclic aromatic hydrocarbon on the phytoremediation of zinc by two plant species (*Brassica juncea* and *Festuca arundinacea*). *International Journal of Phytoremediation*.
- Bell, T. H., Joly, S., Pitre, F. E., & Yergeau, E. (2014). Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches. *Trends in Biotechnology*, 32(5), 271–280.
- Beyer, W. N., Green, C. E., Beyer, M., & Chaney, R. L. (2013). Phytotoxicity of zinc and manganese to seedlings grown in soil contaminated by zinc smelting. *Environmental Pollution*, 179(0), 167–176.
- Bhattacharya, P., Welch, A. H., Stollenwerk, K. G., McLaughlin, M. J., Bundschuh, J., & Panaullah, G. (2007). Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Science of the Total Environment*, 379(2–3), 109–120.
- Boawn, L. C., & Rasmussen, P. E. (1971). Crop response to excessive zinc fertilization of alkaline soil. *Agronomy Journal*, 63(6), 874–876.

- Boisson, J., Mench, M., Vangronsveld, J., Ruttens, a., Kopponen, P., & De Koe, T. (1999). Immobilization of trace metals and arsenic by different soil additives: Evaluation by means of chemical extractions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30(3–4), 365–387.
- Brereton, N. J. B., Berthod, N., Lafleur, B., Pedneault, K., Pitre, F. E., & Labrecque, M. (2017). Extractable phenolic yield variation in five cultivars of mature short rotation coppice willow from four plantations in Quebec. *Industrial Crops and Products*, 97, 525–535.
- Brereton, N. J. B., Gonzalez, E., Marleau, J., Guidi Nissim, W., Labrecque, M., Joly, S., & Pitre, F. E. (2016). Comparative Transcriptomic Approaches Exploring Contamination Stress Tolerance in *Salix* sp. Reveal the Importance for a Metaorganismal de Novo Assembly Approach for Nonmodel Plants. *Plant Physiology*, 171(1), 3–24.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, 173(4), 677–702.
- Brown, S. L., Angle, J. S., Chaney, R. L., & Baker, A. J. M. (1995). Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal*, 59(1), 125–133.
- Brune, A., Urbach, W., & Dietz, K. (1994). Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 17(2), 153–162.
- Bryson, G. M., & Barker, A. V. (2007). Phytoextraction of Zinc by Indian Mustard and Tall Fescue. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(3–4), 315–335.

- Cakmak, I., Kalaycı, M., Ekiz, H., Braun, H. J., Kılınç, Y., & Yılmaz, A. (1999). Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A NATO-science for stability project. *Field Crops Research*, *60*(1), 175–188.
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). (2001). Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health - Arsenic (Inorganic), 7.
- Carroll, M. D., & Loneragan, J. F. (1968). Response of plant species to concentrations of zinc in solution. I. Growth and zinc content of plants. *Crop and Pasture Science*, *19*(6), 859–868.
- Chakraborty, S., Alam, M. O., Bhattacharya, T., & Singh, Y. N. (2014). Arsenic Accumulation in Food Crops: A Potential Threat in Bengal Delta Plain. *Water Quality, Exposure and Health*, *6*(4), 233–246.
- Chaney, R. L. (1993). Zinc phytotoxicity. In *Zinc in soils and plants* (pp. 135–150). Springer.
- Chekol, T., & Vough, L. R. (2001). A Study of the Use of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) for the Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil. *Remediation Journal*, *11*(4), 89–101.
- Clemente, R., Walker, D. J., Roig, A., & Bernal, M. P. (2003). Heavy metal bioavailability in a soil affected by mineral sulphides contamination following the mine spillage at aznalc??llar (Spain). *Biodegradation*, *14*(3), 199–205.
- Cloutier-Hurteau, B., Turmel, M. C., Mercier, C., & Courchesne, F. (2014). The sequestration of trace elements by willow (*Salix purpurea*)-which soil properties favor uptake and accumulation? *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(6), 4759–4771.
- Cloutier, G., Boersma, D., Charlebois, P., Hazra, A., Lau, C., & Thakur, R. (1993). Summary of spill events in Canada 1984-1995, 1087–1088.

- Constantineau, S. (2014). *Variations inter- et intra-spécifiques de la phytoextraction des éléments traces As, Cd, Cu, Ni, Pb et Zn chez trois cultivars de saule*. Université de Montréal.
- Courchesne, F., Turmel, M.-C., Cloutier-Hurteau, B., Tremblay, G., Munro, L., Masse, J., & Labrecque, M. (2017). Soil trace element changes during a phytoremediation trial with willows in southern Québec, Canada. *International Journal of Phytoremediation*, 6514(March), 00–00.
- Danh, L. T., Truong, P., Mammucari, R., & Foster, N. (2014). A Critical Review of the Arsenic Uptake Mechanisms and Phytoremediation Potential of *Pteris vittata*. *International Journal of Phytoremediation*, 16(5), 429–453.
- Desjardins, D., Pitre, F. E., Nissim, W. G., & Labrecque, M. (2016). Differential uptake of silver, copper and zinc suggests complementary species-specific phytoextraction potential. *International Journal of Phytoremediation*, 18(6), 598–604.
- Dickinson, N. M., Baker, A. J. M., Doronila, A., Laidlaw, S., & Reeves, R. D. (2009). Phytoremediation of Inorganics: Realism and Synergies. *International Journal of Phytoremediation*, 11(2), 97–114.
- Dickinson, N. M., & Pulford, I. D. (2005). Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: The evidence trail. *Environment International*, 31(4), 609–613.
- Dong, Y., Ogawa, T., Lin, D., Koh, H.-J., Kamiunten, H., Matsuo, M., & Cheng, S. (2006). Molecular mapping of quantitative trait loci for zinc toxicity tolerance in rice seedling (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Research*, 95(2), 420–425.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., & Egwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5), 112–118.

- Earley, E. B. (1943). Minor element studies with soybeans. I. Varietal reaction to concentrations of zinc in excess of the nutritional requirement. *Journal of the American Society of Agronomy*.
- Evangelou, M. W. H., Ebel, M., & Schaeffer, A. (2007). Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 68(6), 989–1003.
- Farid, M., Ali, S., & Shakoor, M. (2013). EDTA assisted phytoremediation of cadmium, lead and zinc. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(11), 2833–2846.
- Farooq, M. A., Islam, F., Ali, B., Najeeb, U., Mao, B., Gill, R. A., ... Zhou, W. (2016). Arsenic toxicity in plants: Cellular and molecular mechanisms of its transport and metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 132, 42–52.
- Flechas, F. W., & Latady, M. (2003). Phytoremediation. In D. T. Tsao (Ed.) (pp. 171–185). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Foy, C. D., Chaney, R. L. t, & White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1), 511–566.
- Friedland, A. J., & Shaw, A. J. (1989). The movement of metals through soils and ecosystems. *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, 7–20.
- Frouz, J., Kalčík, J., & Velichová, V. (2011). Factors causing spatial heterogeneity in soil properties, plant cover, and soil fauna in a non-reclaimed post-mining site. *Ecological Engineering*, 37(11), 1910–1913.
- Garbisu, C., & Alkorta, I. (2003). Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 3(1), 58–66.

- Gerhardt, K., Huang, X., Glick, B., & Greenberg, B. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science*.
- Gonzalez, E., Brereton, N. J. B., Marleau, J., Guidi Nissim, W., Labrecque, M., Pitre, F. E., & Joly, S. (2015). Meta-transcriptomics indicates biotic cross-tolerance in willow trees cultivated on petroleum hydrocarbon contaminated soil. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 246.
- Grenier, V., Pitre, F. E., Guidi Nissim, W., & Labrecque, M. (2015). Genotypic differences explain most of the response of willow cultivars to petroleum-contaminated soil. *Trees - Structure and Function*, *29*(3), 871–881.
- Grusak, M. A., Pearson, J. N., & Marentes, E. (1999). The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Research*, *60*(1), 41–56.
- Guidi, W., Kadri, H., & Labrecque, M. (2012). Establishment techniques to using willow for phytoremediation on a former oil refinery in southern Quebec: achievements and constraints. *Chemistry and Ecology*, *28*(1), 37–41.
- Guidi Nissim, W., Pitre, F. E., Teodorescu, T. I., & Labrecque, M. (2013). Long-term biomass productivity of willow bioenergy plantations maintained in southern Quebec, Canada. *Biomass and Bioenergy*, *56*, 361–369.
- Habashi, F. (2002). Zinc, the metal from the east. *Metall*, *56*(6), 389–394.
- Hassan, S. E. D., Bell, T. H., Stefani, F. O. P., Denis, D., Hijri, M., & St-Arnaud, M. (2014). Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarbon-contaminated and uncontaminated soils following willow (*Salix* spp. L.) planting. *PLoS ONE*, *9*(7), 1–10.

- Hettick, B. E., Cañas-Carrell, J. E., French, A. D., & Klein, D. M. (2015). Arsenic: A Review of the Element's Toxicity, Plant Interactions, and Potential Methods of Remediation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(32), 7097–7107.
- Hu, Y., Wang, X., Dong, Z., & Liu, G. (2015). Determination of Heavy Metals in the Groundwater of the Huaibei Plain , China , to Characterize Potential Effects on Human Health. *Analytical Letters*, 48(March 2017), 349–359.
- Ikwuemesi, J. C., & Uchendu, I. U. (2016). Potential use of genetically modified plants in cleanup of contaminated soils, 2(2), 35–39.
- Ishimaru, Y., Bashir, K., & Nishizawa, N. K. (2011). Zn uptake and translocation in rice plants. *Rice*, 4(1), 21–27.
- Kabir, E., Ray, S., Kim, K.-H., Yoon, H.-O., Jeon, E.-C., Kim, Y. S., ... Brown, R. J. C. (2012). Current status of trace metal pollution in soils affected by industrial activities. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 916705.
- Kayser, A., Wenger, K., Keller, A., Attinger, W., Felix, H. R., Gupta, S. K., & Schulin, R. (2000). Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: The use of NTA and sulfur amendments. *Environmental Science and Technology*, 34(9), 1778–1783.
- Kochian, L. V. (1993). Zinc absorption from hydroponic solutions by plant roots. In *Zinc in soils and plants* (pp. 45–57). Springer.
- Kulli, B., Balmer, M., Krebs, R., Lothenbach, B., Geiger, G., & Schulin, R. (1999). The Influence of Nitritotriacetate on Heavy Metal Uptake of Lettuce and Ryegrass. *Journal of Environmental Quality*, 28, 1699–1705.

- Le, X. C., Ma, M., Lu, X., Cullen, W. R., Aposhian, H. V., & Zheng, B. (2000). Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine. *Environmental Health Perspectives*, *108*(11), 1015–1018.
- Lee, J. H. (2013). An overview of phytoremediation as a potentially promising technology for environmental pollution control. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *18*(3), 431–439.
- Lee, M., & Yang, M. (2010). Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, *173*(1–3), 589–96.
- Lestan, D., Luo, C. ling, & Li, X. dong. (2008). The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environmental Pollution*, *153*(1), 3–13.
- Leys, N. M., Bastiaens, L., Verstraete, W., & Springael, D. (2005). Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *66*(6), 726–736.
- Li, J., Richter, D. deB, Mendoza, A., & Heine, P. (2010). Effects of land-use history on soil spatial heterogeneity of macro- and trace elements in the Southern Piedmont USA. *Geoderma*, *156*(1–2), 60–73.
- Li, Y., Wang, H., Wang, H., Yin, F., Yang, X., & Hu, Y. (2014). Heavy metal pollution in vegetables grown in the vicinity of a multi-metal mining area in Gejiu, China: total concentrations, speciation analysis, and health risk. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(21), 12569–12582.

- Lombi, E., Zhao, F. J., Fuhrmann, M., Ma, L. Q., & McGrath, S. P. (2002). Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist*, *156*(2), 195–203.
- Mandal, B. K., & Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: A review. *Talanta*, *58*(1), 201–235.
- Marecik, R., Bialas, W., & Cyplik, P. (2012). Phytoremediation potential of three wetland plant species toward atrazine in environmentally relevant concentrations. *Pol. J. Environ. Stud.*, *21*(3), 697–702.
- Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- Martin, B., George, S., & Price, C. (2014). The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, *472*, 642–653.
- Matschullat, J. (2000). Arsenic in the geosphere - A review. *Science of the Total Environment*, *249*(1–3), 297–312.
- McBride, M. B., Martinez, C. E., & Kim, B. (2016). Zn, Cd, S and Trace Metal Bioaccumulation in Willow (*Salix* spp.) Cultivars Grown Hydroponically. *International Journal of Phytoremediation*, *18*(12), 1178–1186.
- MDDELCC. (2015). Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés.
- Meers, E., Hopgood, M., Lesage, E., Vervaeke, P., Tack, F. M. G., & Verloo, M. G. (2004). Enhanced phytoextraction: In search of EDTA alternatives. *International Journal of Phytoremediation*, *6*(2), 95–109.

- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M. J., Samson, D., & Tack, F. M. G. (2005). Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere*, *58*(8), 1011–1022.
- Meers, E., & Vandecasteele, B. (2007). Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany*, *60*(1), 57–68.
- Meharg, A. A., & Hartley-Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, *154*(1), 29–43.
- Mench, M., & Schwitzguébel, J. (2009). Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research*, *16*, 876–900.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, *8*(3), 199–216.
- Ng, J. C., Wang, J., & Shraim, A. (2003). A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*, *52*(9), 1353–1359.
- Nriagu, J. O. (1996). A history of global metal pollution. *Science*, *272*(5259), 223–224.
- Paz-Alberto, A. M. (2013). Phytoremediation: A Green Technology to Remove Environmental Pollutants. *American Journal of Climate Change*, *2*(1), 71–86.
- Peñalosa, J. M., Carpena, R. O., Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M. J., & Esteban, E. (2007). Chelate-assisted phytoextraction of heavy metals in a soil contaminated with a pyritic sludge. *Science of the Total Environment*, *378*(1–2), 199–204.

- Peng, D., Shafi, M., Wang, Y., Li, S., Yan, W., Chen, J., ... Liu, D. (2015). Effect of Zn stresses on physiology, growth, Zn accumulation, and chlorophyll of *Phyllostachys pubescens*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–10.
- Peralta-Videa, J. R., de la Rosa, G., Gonzalez, J. H., & Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research*, 8(3–4), 679–685.
- Peters, R. W. (1999). Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 66(1–2), 151–210.
- Pilon-Smits, E. (2005). PHYTOREMEDIATION. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 15–39.
- Robinson, B. H., Schulin, R., Nowack, B., Roulier, S., Menon, M., Clothier, B., ... Mills, T. (2006). Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *Forest Snow and Landscape Research*, 80(2), 221–234.
- Rosas-Castor, J. M., Guzmán-Mar, J. L., Alfaro-Barbosa, J. M., Hernández-Ramírez, A., Pérez-Maldonado, I. N., Caballero-Quintero, A., & Hinojosa-Reyes, L. (2014). Evaluation of the transfer of soil arsenic to maize crops in suburban areas of San Luis Potosi, Mexico. *Science of the Total Environment*, 497–498, 153–162.
- Ruttens, A., Boulet, J., Weyens, N., Smeets, K., Adriaensen, K., Meers, E., ... Vangronsveld, J. (2011). Short Rotation Coppice Culture of Willows and Poplars as Energy Crops on Metal Contaminated Agricultural Soils. *International Journal of Phytoremediation*, 13(sup1), 194–207.

- Ruttens, A., Mench, M., & Colpaert, J. (2006). Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant. *Environmental Pollution*, *144*(2), 524–532.
- Sakakibara, M., & Watanabe, A. (2010). Phytoextraction and phytovolatilization of arsenic from As-contaminated soils by *Pteris vittata*. *Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy*, *12*(26), 267–272.
- Shahid, M., Austruy, A., Echevarria, G., Arshad, M., Sanaullah, M., Aslam, M., ... Dumat, C. (2013). EDTA-Enhanced Phytoremediation of Heavy Metals: A Review. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, *23*(4), 389–416.
- Shakoor, M. B., Ali, S., Farid, M., Farooq, M. A., Tauqeer, H. M., Iftikhar, U., ... Bharwana, S. A. (2013). Heavy metal pollution, a global problem and its remediation by chemically enhanced phytoremediation: A Review. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*, *3*(3), 12–20.
- Sharma, P., & Pandey, S. (2014). Status of Phytoremediation in World Scenario. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, *2*(4), 178–191.
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2016). Factors Affecting Phytoextraction: A Review. *Pedosphere*, *26*(2), 148–166.
- Smith, E., Smith, J., & Naidu, R. (2006). Distribution and nature of arsenic along former railway corridors of South Australia. *Science of the Total Environment*, *363*(1–3), 175–182.
- Sousa, S. F., Lopes, A. B., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2009). The Zinc proteome: a tale of stability and functionality. *Dalton Transactions*, (38), 7946–7956.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Sinauer Associates.

- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 31 pp.
- Terry, N., & Zayed, A. (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 51(1), 401–432.
- Testiati, E., & Parinet, J. (2013). Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: evaluation of the phytostabilization potential. *Journal of Hazardous Materials*, 248, 131–141.
- Tiedje, J. M., & Mason, B. B. (1974). Biodegradation of nitrilotriacetate (NTA) in soils. *Soil Science Society of America Journal*, 38(2), 278–283.
- Treasury Board of Canada Secretariat. (2017). Find Sites by Classification.
- Tripathi, V., Edrisi, S. A., & Abhilash, P. C. (2016). Towards the coupling of phytoremediation with bioenergy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57, 1386–1389.
- USEPA. (2007). *Treatment technologies for site cleanup: Annual Status Report*.
- Utmazian, M. N. D., & Wenzel, W. W. (2007). Cadmium and zinc accumulation in willow and poplar species grown on polluted soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 170(2), 265–272.
- Vamerali, T., Bandiera, M., Coletto, L., Zanetti, F., Dickinson, N. M., & Mosca, G. (2009). Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environmental Pollution*, 157(3), 887–894.

- Van Slycken, S., Witters, N., Meiresonne, L., Meers, E., Ruttens, A., Van Peteghem, P., ... Vangronsveld, J. (2013). Field Evaluation of Willow Under Short Rotation Coppice for Phytomanagement of Metal-Polluted Agricultural Soils. *International Journal of Phytoremediation*, 15(7), 677–689.
- Vangronsveld, J., Assche, F. Van, & Clijsters, H. (1995). Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environmental Pollution*, 87(1), 51–59.
- Vassilev, A., Schwitzguebel, J.-P., Thewys, T., Van Der Lelie, D., & Vangronsveld, J. (2004). The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *The Scientific World Journal*, 4, 9–34.
- Wang, H. B., Ye, Z. H., Shu, W. S., Li, W. C., Wong, M. H., & Lan, C. Y. (2006). Arsenic uptake and accumulation in fern species growing at arsenic-contaminated sites of southern China: Field surveys. *International Journal of Phytoremediation*, 8(1), 1–11.
- Wang, Q.-R., Cui, Y.-S., Liu, X.-M., Dong, Y.-T., & Christie, P. (2003). Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 38(5), 823–838.
- Wenzel, W., Unterbrunner, R., Sommer, P., & Sacco, P. (2003). Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant and Soil*, 249(1), 83–96.
- White, M. C., Chaney, R. L., & Decker, A. M. (1979). Differential cultivar tolerance in soybean to phytotoxic levels of soil Zn. II. Range of Zn additions and the uptake and translocation of Zn, Mn, Fe, and P. *Agronomy Journal*, 71(1), 126–131.

- Wilson, B., Braithwaite, A., & Brian Pyatt, F. (2005). An evaluation of procedures for the digestion of soils and vegetation from areas with metalliferous pollution. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 87(3), 335–344.
- Winnike- McMillan, S., & Zhang, Q. (2003). Phytoremediation of Methyl Tertiary- Butyl Ether. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants* (pp. 805–828).
- Witters, N., Mendelsohn, R. O., van Slycken, S., Weyens, N., Schreurs, E., Meers, E., ... Vangronsveld, J. (2012). Phytoremediation, a sustainable remediation technology? Conclusions from a case study. I: Energy production and carbon dioxide abatement. *Biomass and Bioenergy*, 39, 454–469.
- Witters, N., van Slycken, S., Ruttens, A., Adriaensen, K., Meers, E., Meiresonne, L., ... Vangronsveld, J. (2009). Short-rotation coppice of willow for phytoremediation of a metal-contaminated agricultural area: A sustainability assessment. *Bioenergy Research*, 2(3), 144–152.
- Wuana, R. a., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*, 2011, 1–20.
- Xuan, T., Nguyen, T., Amyot, M., & Labrecque, M. (2017). Differential effects of plant root systems on nickel , copper and silver bioavailability in contaminated soil. *Chemosphere*, 168, 131–138.
- Yang, Z., Wang, W., Li, B., Guo, Y., & Wang, H. (2008). Study on characteristics of Lolium multiflorum and Festuca arundinacea absorbing and accumulating cadmium, lead and zinc from contaminated soil with these metals. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2, 19.

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

Zamani, N., Sabzalian, M. R., Khoshgoftarmanesh, A., & Afyuni, M. (2015). *Neotyphodium* Endophyte Changes Phytoextraction of Zinc in *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. *International Journal of Phytoremediation*, 17(5), 456–463.