



HAL
open science

Évaluation des impacts environnementaux de l'apport des boues urbaines liquides sur les plants de Mélèzes cultivés sur un sol acide: Bénéfices et risques

Mohamed Bourioug

► **To cite this version:**

Mohamed Bourioug. Évaluation des impacts environnementaux de l'apport des boues urbaines liquides sur les plants de Mélèzes cultivés sur un sol acide: Bénéfices et risques. Sciences de l'environnement. Université de Franche-Comté, 2013. Français. NNT: . tel-01161577

HAL Id: tel-01161577

<https://hal.science/tel-01161577>

Submitted on 8 Jun 2015

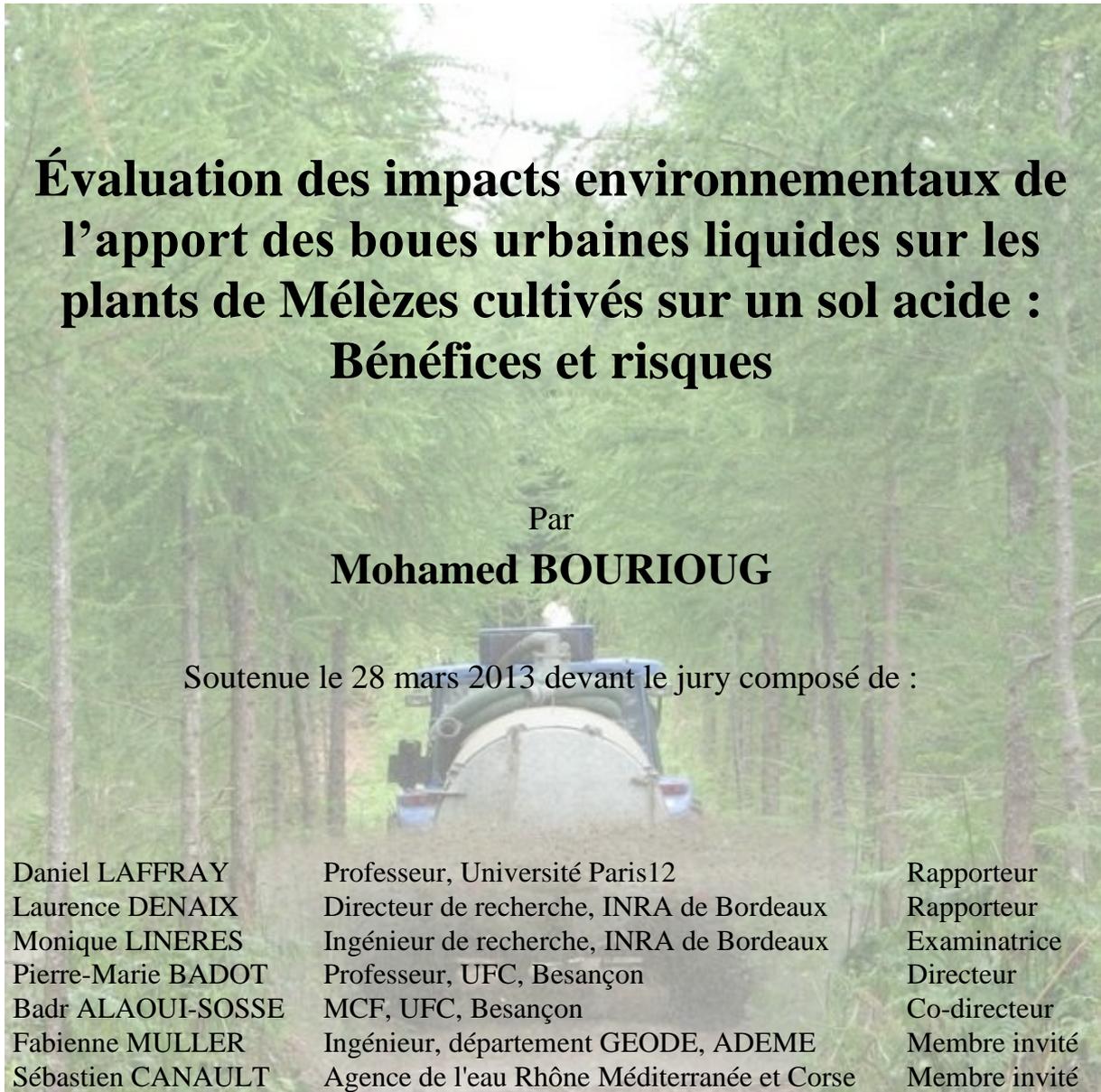
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES
LABORATOIRE CHRONO-ENVIRONNEMENT
(UMR 6249 UFC/CNRS)

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
Spécialité Sciences de la Vie et de l'Environnement
École doctorale Environnements, Santé



Évaluation des impacts environnementaux de l'apport des boues urbaines liquides sur les plants de Mélèzes cultivés sur un sol acide : Bénéfices et risques

Par

Mohamed BOURIOUG

Soutenue le 28 mars 2013 devant le jury composé de :

Daniel LAFFRAY	Professeur, Université Paris12	Rapporteur
Laurence DENAIX	Directeur de recherche, INRA de Bordeaux	Rapporteur
Monique LINERES	Ingénieur de recherche, INRA de Bordeaux	Examinatrice
Pierre-Marie BADOT	Professeur, UFC, Besançon	Directeur
Badr ALAOUI-SOSSE	MCF, UFC, Besançon	Co-directeur
Fabienne MULLER	Ingénieur, département GEODE, ADEME	Membre invité
Sébastien CANAULT	Agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse	Membre invité

Dédicaces

A l'âme de mon père qui m'a quitté depuis mon plus jeune âge sans me voir parcourir ce long chemin ;

A ma mère, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a jamais cessé de prier pour moi ;

A ma grand-mère, celle qui a sacrifié tout sans limite et elle continue encore ;

A mes frères et ma sœur.



Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur Daniel Laffray et Madame Laurence Denaix pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et de l'honneur qu'ils me font en acceptant de rapporter ce travail.

Merci à Madame Monique Linères pour l'intérêt qu'elle a témoigné à ce travail depuis son lancement et particulièrement en acceptant de participer au jury

J'exprime également ma reconnaissance à mes directeurs de thèse et encadrants, Messieurs Pierre-Marie Badot, Badr Alaoui-Sossé et Mohammed Benbrahim, ainsi que Madame Laurence Alaoui-Sossé. Merci infiniment pour les valeurs que vous m'avez transmis: de la passion à la rigueur scientifique.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe RITTMO à Colmar pour m'avoir accueilli chaleureusement dans leur laboratoire et m'instruire mes premières notions d'écotoxicologie aquatique.

Un immense merci pour les chercheurs : Eric Lucot (Pédologie), Olivier Girardclos (Dendrologie), François Gillet (Floristique), Frédérique Gimbert et Annette de Vaufleury (Ecotoxicologie terrestre), Fabienne Tatin-Froux et Xavier Laffray (Ecophysiologie végétale) qui ont contribué énormément à l'interdisciplinarité de mon travail de recherche.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à l'encadrement technique de Mesdames Nadia Crini, Marie-Laure Toussaint et monsieur Dominique Rieffel.

Un grand merci à monsieur Yves Petronelli (adjoint municipal de la mairie de Mélisey), ainsi que à toute l'équipe technique pour leur collaboration et leur disponibilité durant ce projet.

J'exprime toute ma gratitude à l'ADEME, le conseil régional et l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse pour avoir financé ce travail de recherche.

Je souhaite remercier Raouf Naoufal, Benoit Bellot, Sylvain Corbel, Franck Frenaisin et dont l'aide m'a été essentielle, et sans laquelle je n'aurais pu obtenir autant de résultats expérimentaux.

Merci à tout le personnel du laboratoire Chrono-environnement et de l'université de Franche-Comté que j'ai côtoyé durant ce travail

Ce travail de thèse a fait l'objet des publications et communications suivantes :

Liste des publications:

- Bourioug M.**, Alaoui-Sehmer L., Laffray X., Raouf N., Benbrahim M., Badot P.M., Alaoui-Sossé B. “ Evaluation of sewage sludge effects on soil properties, plant growth, mineral nutrition state and heavy metal distribution in European larch seedlings (*Larix decidua*)”: soumise à la revue “Environmental Monitoring and Assessment” (**Annexe 14**).
- Bourioug M.**, Gimbert F., Laffray X., Alaoui-Sehmer L., Benbrahim M., Badot P.M., Alaoui-Sossé B. Risk assessment of trace metal contaminants in sewage sludge applied to forest soil: effects on bioavailability and transfer along a soil-plant-snail food chain: soumise à la revue “Ecotoxicology and Environmental Safety” (**Chapitre 4**).
- Bourioug M.**, Gimbert F., Laffray X., Alaoui-Sehmer L., Benbrahim M., Badot P.M. & Alaoui-Sossé B. Growth and trace metals accumulation responses of snails (*Cantareus aspersus*) exposed to sewage sludge in forest plantation (En préparation).

Liste des communications:

- Bourioug M.**, Alaoui-Sehmer L., Raouf N., Laffray X., Benbrahim M., Badot P.M. & Alaoui-Sossé B. Evaluation of municipal sewage sludge impacts on forest ecosystems: benefits and risks. Integrated Water Resources Management and Challenges of the Sustainable Development, 24-26 March 2010. Agadir (Maroc). Poster
- Laffray X., **Bourioug M.**, Alaoui-Sehmer L., Badot P.M., Lemal L. & Alaoui-Sossé B. Effects of paper mill sludge on soil properties and on growth and nitrogen content of sunflower (*Helianthus annuus*). Integrated Water Resources Management and Challenges of the Sustainable Development, 24-26 March 2010. Agadir (Maroc). Poster
- Bourioug M.**, Alaoui-Sehmer L., Benbrahim M., Laffray X., Badot P.M. & Alaoui-Sossé B. Evaluation of municipal sewage sludge impacts on forest ecosystems: advantages and risks. Forum des Jeunes Chercheurs (FJC) 2011, 16 et 17 juin 2011. Dijon, France. Communication orale.
- Bourioug M.**, Gimbert F., Laffray X., Alaoui-Sehmer L., Benbrahim M., Badot P.M. & Alaoui-Sossé B. Growth and trace elements accumulation responses of snails (*Helix aspersa*) exposed to sewage sludge in forest ecosystem. Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 22 juin 2011. Paris, France. Poster.
- Bourioug M.**, Gimbert F., Alaoui-Sehmer L., Benbrahim M., Badot P.M. & Alaoui-Sossé B. Les réponses écotoxicologiques des escargots *Cantareus aspersus* exposés à des sols amendés par les boues urbaines. 4^{ème} Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA, Saint Lager, 7-9 Novembre 2011. Poster.
- Bourioug M.**, Alaoui-Sehmer L., Benbrahim M., Laffray X., Badot P.M. & Alaoui-Sossé B. Effects of liquid sewage sludge applied to european larch (*larix decidua* l.): benefits and risks. 3^{ème} Congrès International sur l'Eau, Déchets et Environnement (EDE3). 21-23 novembre 2011. Fès (Maroc). Communication orale.
- Bourioug M.**, Alaoui-Sehmer L., Benbrahim M., Badot P.M. & Alaoui-sossé B. Valorisation sylvicole des boues urbaines : évaluation de l'impact sur le sol. 11^{èmes} Journées d'Etudes des Sols (JES). 19 au 23 mars 2012. INRA de Versailles. Poster.
- Bori A., **Bourioug M.**, Mohamed N., Alaoui-Sossé B., Cavalli E. Etude pilote de la fiabilité d'épuration des eaux usées par les supports granulaires. Forum des Jeunes Chercheurs (FJC), 6 et 7 septembre 2012. Besançon, France. Poster.

Sommaire

Sommaire	1
Résumé	7
Abstract.....	9
Liste des figures.....	11
Liste des tableaux.....	17
Liste des annexes	19
Glossaire des abréviations	21

INTRODUCTION GENERALE	23
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27

1. GENERALITES.....	29
2. EPANDAGES DE BOUES D'EPURATION URBAINES SUR DES TERRES AGRICOLES	31
2.1. LES BENEFICES	31
2.1.1. LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU SOL.....	31
2.1.2. LES PROPRIETES MICROBIENNES ET ENZYMATIQUES DU SOL	32
2.1.3. LES ELEMENTS MINERAUX	32
2.2. LES RISQUES	33
2.2.1. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES	34
2.2.2. LES COMPOSES TRACES ORGANIQUES.....	34
2.2.3. LES MICRO-ORGANISMES	35
2.3. REGLEMENTATION	35
3. EPANDAGE SYLVICOLE : UNE ALTERNATIVE COMPLEMENTAIRE A L'EPANDAGE AGRICOLE.....	37
3.1. L'ECOSYSTEME FORESTIER	37
3.2. LE RESEAU ERESFOR	38
3.3. CONCLUSION	39
4. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	40

MATERIELS & METHODES	43
---------------------------------------	-----------

1. DESCRIPTION DU SITE	45
1.1. INTRODUCTION - CONTEXTE	45
1.2. LOCALISATION DU SITE.....	45
1.3. CARACTERISATION DU SOL	47
1.4. CARACTERISATION DES BOUES EPANDUES.....	48
1.5. LE DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	49
1.6. RECOLTE DES ECHANTILLONS.....	50
1.6.1. LE SOL	50
1.6.2. LA SOLUTION DU SOL ET L'EAU DE LA NAPPE	50
1.6.3. LES AIGUILLES ET LES CHAMPIGNONS.....	50
1.7. LA CROISSANCE RADIALE ET LA HAUTEUR DES ARBRES.....	51
1.8. LE SOUS-BOIS	51
2. ETUDE AU LABORATOIRE	52
2.1. CULTURE DES PLANTS	52
2.1.1. LE MATERIEL VEGETAL.....	52
2.1.2. LE SUBSTRAT.....	52
2.1.3. LES CONDITIONS DE CULTURE.....	53

2.1.4.	MISE EN CULTURE.....	53
2.2.	LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	53
2.3.	CALCUL DES DOSES DE BOUES	54
2.4.	RECOLTES DES SEMIS ET CINETIQUES EXPERIMENTALES.....	54
2.5.	L'ECHANTILLONNAGE.....	55
2.5.1.	LE VEGETAL.....	55
2.5.2.	LE SOL	55
3.	LES PARAMETRES D'ANALYSES	56
3.1.	LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	56
3.1.1.	LE pH.....	56
3.1.2.	LE POTENTIEL REDOX.....	56
3.2.	ANALYSE DE CROISSANCE ET MESURES ECOPHYSIOLOGIQUES	56
3.2.1.	LA CROISSANCE ET LE POTENTIEL HYDRIQUE MINIMUM	56
3.2.2.	LA BIOMASSE SECHE.....	56
3.2.3.	L'ACCROISSEMENT DES CERNES	56
3.2.4.	LES ECHANGES GAZEUX.....	57
3.3.	ANALYSES CHIMIQUES	57
3.3.1.	L'AZOTE KJELDAHL.....	57
3.3.2.	LE CARBONE ORGANIQUE, L'AZOTE TOTAL ET LE RAPPORT C/N	57
3.3.3.	L'AZOTE MINERAL.....	58
3.3.4.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES ET LES ELEMENTS MINERAUX	58
3.4.	LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES.....	59
3.4.1.	LA NITRATE REDUCTASE	59
3.4.2.	LA SUPEROXYDE DISMUTATSE	59
3.4.3.	LA CHLOROPHYLLE.....	60
4.	ECOTOXICITE DES EPANDAGES DE BOUES.....	60
4.1.	L'ECOTOXICITE AQUATIQUE : MODELE « LENTILLES D'EAU ».....	61
4.1.1.	PREPARATION DES LIXIVIATS.....	61
4.1.2.	LA MISE EN CULTURE.....	61
4.2.	L'ECOTOXICITE TERRESTRE : MODELE « ESCARGOT ».....	62
4.2.1.	EN CONDITIONS CONTROLEES	62
4.2.2.	EN CONDITIONS NATURELLES	64
5.	LES ANALYSES STATISTIQUES	64

CHAPITRE I

Épandage de boues de station d'épuration en parcelles boisées : Quels impacts sur le sol ?

1.	ETUDE AU LABORATOIRE	67
1.1.	LE pH.....	67
1.2.	LE POTENTIEL REDOX	67
1.3.	L'AZOTE TOTAL ET LE RAPPORT C/N	68
1.4.	LE PHOSPHORE	70
1.5.	LE POTASSIUM.....	71
1.6.	LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX (EM)	71
1.7.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES (ETM).....	73
1.7.1.	LE CUIVRE ECHANGEABLE.....	73
1.7.2.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES TOTAUX	73
2.	ETUDE SUR LE TERRAIN.....	75
2.1.	LE pH.....	75

2.2.	L'AZOTE KJELDAHL ET L'AZOTE MINERAL.....	75
2.3.	LE PHOSPHORE ET LE POTASSIUM	77
2.4.	LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX.....	78
2.5.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES	79
2.5.1.	LE CUIVRE ECHANGEABLE.....	79
2.5.2.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES TOTAUX	80
3.	DISCUSSION.....	81
3.1.	ÉVOLUTION DES CARACTERISTIQUES DU SOL.....	81
3.2.	ÉVOLUTION DES TENEURS EN NPK.....	82
3.2.1.	L'AZOTE.....	82
3.2.2.	LE PHOSPHORE	84
3.2.3.	LE POTASSIUM.....	85
3.3.	ÉVOLUTION DES TENEURS EN ELEMENTS MINERAUX	86
3.4.	ÉVOLUTION DES TENEURS EN ELEMENTS TRACES METALLIQUES	86
4.	CONCLUSION.....	89

CHAPITRE II

Épandage de boues de station d'épuration en parcelles boisées : Quels impacts sur les ressources hydriques?

1.	COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFERENTS COMPARTIMENTS HYDRIQUES:	93
1.1.	L'AZOTE MINERAL	93
1.2.	LE PHOSPHORE ET LE POTASSIUM	95
1.3.	LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX.....	96
1.4.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES	98
2.	ECOTOXICITE DES LIXIVIATS	101
2.1.	IMPACTS DES LIXIVIATS SUR LES LENTILLES D'EAU	101
2.1.1.	SANS AJUSTEMENT DE pH	101
2.1.2.	APRES AJUSTEMENT DE pH	101
3.	COMPOSITION DES LIXIVIATS EN ELEMENTS MINERAUX ET ELEMENTS TRACES METALLIQUES	104
4.	DISCUSSION.....	105
4.1.	L'AZOTE MINERAL	105
4.2.	LE PHOSPHORE, LE POTASSIUM ET LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX	106
4.3.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES	107
4.4.	L'IMPACT DES BOUES SUR LES LENTILLES D'EAU	108
5.	CONCLUSION.....	109

CHAPITRE III

Épandage de boues de station d'épuration en parcelles boisées : Quels impacts sur la productivité et les transferts des éléments traces métalliques (ETM) vers les espèces ligneuses : exemple du mélèze ?

1.	ETUDE AU LABORATOIRE	113
1.1.	LES PARAMETRES DE COISSANCE	113
1.1.1.	LA CINETIQUE DE LA CROISSANCE DES TIGES.....	113
1.1.2.	L'ELONGATION DE LA TIGE PRINCIPALE, DES RAMIFICATIONS ET DE LA RACINE	114
1.1.3.	L'ACCUMULATION DE LA BIOMASSE	116
1.1.4.	LE TAUX DE CROISSANCE RELATIVE « <i>Relative Growth Rate (RGR)</i> »	116
1.1.5.	LA CROISSANCE RADIALE	117
1.2.	LES PARAMETRES CHIMIQUES	120

1.2.1.	L'AZOTE TOTAL	120
1.2.2.	LE PHOSPHORE	121
1.2.3.	LE POTASSIUM.....	122
1.2.4.	LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX (Mg, Ca, Mn et Na)	123
1.2.5.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES (Cu, Zn, Pb et Cd).....	127
1.2.6.	DISTRIBUTION DES EM ET DES ETM DANS LES CERNES.....	131
1.3.	LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES.....	133
1.3.1.	LES ACTIVITES ENZYMATIQUES	133
1.3.2.	LES ECHANGES GAZEUX.....	134
1.3.3.	LA CHLOROPHYLLE.....	135
1.3.4.	LE POTENTIEL HYDRIQUE MINIMUM	136
2.	ETUDE <i>IN SITU</i>	137
2.1.	LA CIRCONFERENCE ET LA HAUTEUR DES ARBRES.....	137
2.2.	LE SOUS-BOIS	139
2.3.	LES TRANSFERTS SOL-PLANTE	143
2.4.	LES TRANSFERTS SOL-CHAMPIGNONS	144
3.	DISCUSSION.....	146
3.1.	LA CROISSANCE ET LE STATUT NUTRITIONNEL	146
3.2.	LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES	152
4.	CONCLUSION.....	155

CHAPITRE IV

Épandage de boues de station d'épuration en parcelles boisées : Quels impacts sur le continuum sol-plante-escargot ?

1.	ETUDE SUR LE TERRAIN.....	159
1.1.	BIOACCUMULATION DES ETM	159
1.1.1.	CONCENTRATION DES ETM DANS LE SOL.....	159
1.1.2.	CONCENTRATIONS DES ETM DANS LES PLANTES.....	159
1.1.3.	TENEURS TOTALES EN ETM DANS LES ESCARGOTS.....	160
1.2.	SURVIE ET CROISSANCE.....	161
1.2.1.	LA SURVIE	161
1.2.2.	LA MASSE TOTALE	161
1.2.3.	LA BIOMASSE SECHE.....	161
1.2.4.	LA MASSE DE LA COQUILLE	162
2.	DISCUSSION.....	163
2.1.	TENEURS DU SOL EN ETM ET LE TRANSFERT SOL-PLANTE.....	163
2.2.	BIOACCUMULATION DES ETM DANS LES ESCARGOTS	163
2.3.	LA CROISSANCE DES ESCARGOTS	166
3.	ETUDE AU LABORATOIRE	167

"Risk assessment of trace metal contaminants in sewage sludge applied to forest soil: Effects on bioavailability and transfer along a soil-plant-snail food chain"

3.1.	ABSTRACT.....	167
3.2.	INTRODUCTION	168
3.3.	MATERIALS AND METHODS	169
3.3.1.	SOIL AND SEWAGE SLUDGE (SS).....	169
3.3.2.	EXPERIMENTAL PROTOCOL	169
3.3.3.	METAL ANALYSIS	170

3.3.4.	STATISTICAL ANALYSIS.....	170
3.4.	RESULTS.....	171
3.4.1.	EFFECT OF SS APPLICATION ON SOIL.....	171
3.4.2.	EFFECT OF SS APPLICATION ON LETTUCE.....	171
3.4.3.	SNAIL MORTALITY AND GROWTH.....	172
3.4.4.	SNAIL BIOACCUMULATION OF ESSENTIAL ELEMENTS (Cu & Zn).....	174
3.4.5.	SNAIL BIOACCUMULATION OF NON-ESSENTIAL METALS (Pb & Cd).....	175
3.5.	DISCUSSION.....	177
3.5.1.	EFFECTS OF SS ON LETTUCE AND SNAIL GROWTH.....	177
3.5.2.	METAL INPUTS IN AMENDED SOIL AND THEIR BIOAVAILABILITY TO LETTUCE AND SNAIL..	178
3.6.	CONCLUSION.....	179
3.7.	REFERENCES.....	180

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	185
ANNEXES.....	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	229

Résumé

La valorisation des déchets organiques peut constituer un bon outil pour remédier aux problèmes d'appauvrissement des sols par des cultures intensives d'une part et pour limiter les coûts de fertilisation d'autre part. Face à une production de boues de STEP croissante et à une réutilisation agricole de ces boues de plus en plus marginalisée, l'épandage dans les plantations forestières pourrait constituer une voie alternative complémentaire. Cet épandage permet un apport d'azote et de phosphore très bénéfique pour les sols généralement pauvres. Cependant, les contaminants présents dans certaines boues et en particulier les éléments traces métalliques (ETM), présentent un risque d'accumulation dans les sols ainsi que de contamination des milieux aquatiques et de transfert à l'ensemble de l'écosystème via la chaîne trophique. L'objectif de cette étude est d'évaluer les bénéfices et les risques suite à l'application des boues liquides sur (i) la croissance et le statut nutritionnel chez le mélèze (ii) sur les transferts de contaminants (ETM) à la solution du sol, aux plantes (iii) ainsi que le long de la chaîne trophique.

Ce travail a été réalisé à la fois en conditions contrôlées sur de jeunes mélèzes d'un an cultivés en pots sur un sol acide avec un apport de 30 t de MS ha⁻¹ et de 60 t de MS ha⁻¹ et sur le terrain, où des mini-placettes au sein d'une plantation de mélèze ont reçu 6 t MS ha⁻¹. Les effets à court et à moyen terme étudiés dans ces expérimentations ont montré que l'apport de boues liquides a eu un effet bénéfique sur la qualité du sol grâce à leur effet fertilisant marqué pour l'azote et pour le phosphore, mais pas pour les autres éléments minéraux. Ce dernier résultat serait dû aux faibles teneurs en ces éléments nutritifs présents dans les boues épandues. Les teneurs en cuivre et en zinc mesurées dans l'horizon supérieur du sol ont augmenté significativement de manière proportionnelle à la dose de boues alors qu'aucun effet n'est observé sur les horizons profonds.

En dépit de la faible lixiviation des nitrates détectée à 20 cm de profondeur, il convient de souligner le danger potentiel de contamination de la nappe. La migration du P et des ETM dans le profil du sol n'a pas été observée. Il est probable que ces éléments sont retenus en surface soit par la matrice solide du sol (pour le P), soit par la matière organique (pour les ETM). Cependant, la culture de *Lemna minor* effectuée sur les lixiviats bruts montre une stimulation de la croissance dans le cas de l'apport de 60 t ha⁻¹ et constituerait donc un risque d'eutrophisation en cas de lixiviation intense.

L'application des boues n'engendre aucune toxicité pour les plants de mélèze qui ont manifesté un taux de reprise supérieur à 98 %. Les résultats obtenus au cours de notre étude en conditions contrôlées ont montré une meilleure croissance en hauteur à partir du 7ème mois après l'apport des boues. Cette réponse différée s'expliquerait par le temps nécessaire à la minéralisation de la matière organique apportée qui améliore le statut nutritionnel des jeunes semis. Cette amélioration de nutrition azotée et phosphatée serait à l'origine de la stimulation de l'activité photosynthétique observée au stade 6 mois et qui fournirait donc l'énergie nécessaire à l'accumulation de biomasse enregistrée à la récolte de 12 mois. In situ, les travaux n'ont montré aucun effet ni sur la croissance (hauteur, circonférence) ni sur la biodiversité de la strate herbacée. Les différences observées entre les arbres sont d'avantage liées aux caractéristiques pédologiques de la station (profondeur du sol, hydromorphie) plutôt

qu'à l'épandage des boues d'épuration effectué à très faible taux (6 t ha^{-1}). Les aiguilles des plants cultivées en conditions contrôlées accumulent du Cu, du Zn et du Cd alors que le Pb reste majoritairement séquestré dans les racines latérales. Néanmoins, les valeurs enregistrées étaient inférieures au seuil minimum de toxicité, ainsi aucun effet néfaste n'a été observé.

L'évaluation des risques de l'épandage des boues sur les réseaux trophique a été étudiée in situ et en conditions contrôlées à travers le modèle de transfert sol-plante-escargot. L'étude réalisée in situ a montré que la mortalité et la décroissance pondérale observées chez les escargots placés dans les mésocosmes seraient dues aux conditions environnementales, telles que la température, la photopériode et ou à la nature de la végétation. Par contre en conditions contrôlées, la double exposition des escargots (sols et laitue contaminés) a eu un effet bénéfique sur leur croissance. Ce résultat pourrait être dû à une meilleure qualité nutritive des plants de laitues cultivées sur sol amendé par rapport au contrôle. Cette augmentation de biomasse influence positivement les quantités d'ETM accumulés dans le corps mou des escargots sans aucun effet toxique décelable.

Mots clés : boues résiduaire, plantations forestières, *Larix decidua*, nutrition minérale, éléments traces métalliques, lessivage, écotoxicité, chaîne trophique.

Abstract

Organic waste valorization can be a good tool to remedy soil impoverishment problems through intensive cultivation and also to reduce fertilizer costs. Facing a growing sewage sludge production and a sludge reutilization in agriculture increasingly marginalized, the spreading in forest plantations could be a complementary alternative way. This spreading allows nitrogen and phosphorus supplies which are very beneficial for soils generally poor. Nevertheless, some contaminants in sludge, particularly trace metals (TMs), present a risk due to soil accumulation on these contaminants, aquatic contamination and transfer to the entire ecosystem through the food chain. The objective of this study was to evaluate the benefits and risks following liquid sludge application at: (i) growth and nutritional status of larch (ii) contaminants (TMs) transfer to soil solution, plants (iii) and along the food chain.

This work was conducted both under controlled conditions on young larch one year aged, grown in pots on an acidic soil amended with 30 t DW ha⁻¹ and 60 t DW ha⁻¹ as in the field, in sub-plots within a larch plantation and receiving 6 t DW ha⁻¹. The effects of short and medium term showed that liquid sludge application had a beneficial effect on soil quality because improved levels of nitrogen and phosphorus, but not for other mineral elements. This last result may be due to low levels of these nutrients in the used sludge. Concentrations of copper and zinc in the upper soil were increased significantly in proportion to the sludge rate, while no effect was observed on deep soil horizons.

Despite the low nitrate leaching detected at 20 cm depth, it is worth noting the potential danger of groundwater contamination. The migration of P and TMs in the soil profile was not observed in this work. It is probable that these elements are sequestered on the upper layer either by the solid matrix of the soil (for P) or by the organic matter (for TMs). However, the culture of *Lemna minor* conducted on the raw leachates showed a stimulation of growth after 60 t ha⁻¹ supply. This response could be a risky situation (eutrophication) in case of intense leaching.

Sludge application did not induce any toxicity to larch plants which showed a recovery rate higher than 98%. The results obtained in this study under controlled conditions showed a better growth in height beginning from the seventh month after sludge supply. This delayed response could be explained by the time required for mineralization of provided organic matter that improved the nutritional status of young seedlings. This improvement in nitrogen and phosphorus nutrition could account for the observed stimulation of photosynthetic activity at 6 months stage, which provides the energy needed for biomass accumulation at 12 months stage. In situ, the works did not show any effect on either growth (height, circumference) or biodiversity of the herbaceous stratum. The differences observed between trees were further related to pedological characteristics of the station (soil depth, waterlogging) rather than the supply of sewage sludge performed at very low rate (6 t ha⁻¹). The plant needles grown in controlled conditions accumulated Cu, Zn and Cd, while Pb was mostly sequestered in lateral roots. Nevertheless, the recorded values were below the minimum threshold of toxicity, thus no adverse effects were observed.

The risk assessment of SS application on the trophic chain has been studied in situ and under controlled conditions via the transfer model soil-plant-snail. The study carried out in

situ showed that mortality and weight decrease observed in snails placed in mesocosms might account for the environmental conditions such as temperature, photoperiod and/or the nature of the vegetation. By contrast, under controlled conditions, snail exposure both to contaminated lettuce and amended soil had a beneficial effect on their growth parameters. This result could be due to a high nutritional quality of lettuce plants grown on amended soil compared to control. This growth stimulation induced an increase in the levels ETM snail soft body without any detectable toxic effect.

Key Words: Sewage sludge, forest plantations, *Larix decidua*, mineral nutrition, trace metals, leaching, ecotoxicity, trophic chain.

Liste des figures

Figure 1 : La production de déchets et les voies d'élimination et de valorisation en France.	30
Figure 2 : Evolution des voies d'élimination des boues de STEP en France et parallèle à la production (2003-2008)	30
Figure 3 : Schéma illustratif du comportement et du devenir des éléments : N, P et K après épandage de boues.	33
Figure 4 : Représentation schématique de la dynamique des éléments nutritifs en forêt.	37
Figure 5 : Localisation des sites gérés par le réseau ERESFOR	39
Figure 6 : Schéma illustratif des paramètres étudiés lors de ce travail de thèse.	41
Figure 7 : Photo aérienne du site d'étude (triangle rouge) (Géoportail, 2012).....	46
Figure 8 : Carte topographique de la zone d'étude (triangle rouge) (Géoportail, 2012).....	46
Figure 9 : Carte géologique de la zone d'étude (triangle rouge) (Géoportail, 2012).....	47
Figure 10 : Cartographie de la profondeur du sol (vert : 0-40 cm, bleu : 45-75 cm et rouge : >80 cm).	47
Figure 11 : Photographies des différents profils du sol.	48
Figure 12 : Schéma du dispositif expérimental comprenant 3 répétitions de témoins (T) et de boues (B).....	49
Figure 13 : a) Disposition des bougies poreuses dans une sous placette « B' » délimité par le carré rouge, b) Prélèvement de la solution du sol.....	50
Figure 14 : Dispositif utilisé pour l'évaluation des indices de biodiversité du sous-bois.....	52
Figure 15 : Les plants de mélèze en godet.	52
Figure 16 : Plants de mélèze :a) racines nues, b) débourrement des bourgeons, c) développement des rameaux secondaires.	53
Figure 17 : Représentation schématique du plan expérimental.....	55
Figure 18 : a) Chambre à conifère, b) Disposition du rameau dans la chambre durant la mesure	57
Figure 19 : a) Nursery : Boîtes à souris (1 et 2) empilées contenant des naissains : (P) un papier absorbant humide recouvre le fond. Le nettoyage et la nourriture (H ₁) : Helixal [®] premier âge) sont effectués trois fois par semaine. b) Phase de croissance : Dans la cage d'élevage, les juvéniles sont nourris avec Helixal [®] deuxième âge (H ₂).....	62
Figure 20 : Schéma du dispositif expérimental (S : sol, B : boues, E : escargots). Chaque traitement est répété trois fois.....	63
Figure 21 : Culture de la laitue sur le sol de Melisey : a) sol témoin, b) sol amendé (30 t MS ha ⁻¹).....	63
Figure 22 : Exposition des escargots au sol témoin (a) et au sol amendé (b). (S : sol, B : boues, L : laitues, E : escargots)	64
Figure 23 : a) Microcosmes installés dans une sous-placette, b) Vue interne d'un microcosme : (M) : microcosmes, (A) : deux morceaux de tuiles servant d'abris aux escargots, (E) : escargots).	64
Figure 24 : Variations du pH de l'horizon supérieur (H ^{>}) et inférieur (H ^{<}) du pot en fonction du temps de culture. Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). Les lettres indiquent les différences significatives entre les H ^{>} des différents traitements (T : Témoin ; B1 :30 t MS ha ⁻¹ et B2 : 60 t MS ha ⁻¹) d'une même récolte	67
Figure 25 : Variations du potentiel d'oxydoréduction (Eh) en fonction de la durée de culture. Les mesures ont été effectuées juste avant le dépotage (T : Témoin ; B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreur représentent les écart-types (n=5). Aucune différence significative n'a été détectée	68
Figure 26 : Effet de l'épandage de boue sur les teneurs en azote (%N) au niveau de l'horizon supérieur (H ^{>}) et inférieur (H ^{<}) du pot durant les différentes durées de culture (T : Témoin ; B1 :30 t MS ha ⁻¹ et B2 : 60 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). Pour la même récolte, les moyennes de l'horizon supérieur (H ^{>}) qui n'ont pas la même lettre sont significativement différentes à p<0,05.	68
Figure 27 : Variations des teneurs en P total (mg g ⁻¹ MS) de l'horizon supérieur (H ^{>}) et inférieur (H ^{<}) du pot en fonction de la durée de culture après épandage (T : Témoin ; B1 :30 t MS ha ⁻¹ et B2 : 60 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). Pour la même récolte, les moyennes de l'horizon supérieur (H ^{>}) qui n'ont pas la même lettre sont significativement différentes à p<0,05.	70
Figure 28 : Variations des teneurs en K (mg g ⁻¹ MS) de l'horizon supérieur (H ^{>}) et inférieur (H ^{<}) du pot durant les différentes durées de culture après l'application des boues (T : Témoin ; B1 :30 t MS ha ⁻¹ et B2 : 60 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5).....	71
Figure 29 : Variations des teneurs en éléments minéraux : Mg, Ca, Na et Mn (mg g ⁻¹ MS) de l'horizon supérieur (H ^{>}) et inférieur (H ^{<}) du pot durant les différentes durées de culture après l'application des boues (T : Témoin ; B1 :30 t MS ha ⁻¹ et B2 : 60 t MS ha ⁻¹) (n=5). Aucune différence significative n'a été détectée.	72

Figure 30 : Variations des teneurs en éléments trace métalliques : Cu, Zn, Pb et Cd (mg g ⁻¹ MS) de l'horizon supérieur (H<) et inférieur (H>) du pot durant les différentes durées de culture après l'application des boues (T : Témoin ; B1 : 30 t MS ha ⁻¹ et B2 : 60 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). Pour la même récolte, les moyennes de l'horizon supérieur (H<) qui n'ont pas la même lettre sont significativement différentes à p<0,05.	74
Figure 31 : Variations du pH de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral (S) après l'apport de boues (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). ***Différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement à p<0,001	75
Figure 32 : Variations de l'azote Kjeldahl au niveau de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). *Différences significatives entre traitement d'un même prélèvement à p<0,05	76
Figure 33 : Variation de de l'azote minéral (nitrate et ammonium) au niveau de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral sous-jacent (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). Différences significatives entre traitement d'un même prélèvement *p<0,05 et ** p<0,01	77
Figure 34 : Variations des teneurs (a) en P total et (b) en K (mg g ⁻¹ MS) de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). Différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement à *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001. Aucune différence significative n'a été détectée pour le K.....	78
Figure 35 : Variations des teneurs en éléments minéraux: Mn, Ca, Mg et Na (mg g ⁻¹ MS) de l'horizon litière (L) et de l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs et les astérisques représentent respectivement les écart-types (n=5) et les différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement (*p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001)	79
Figure 36 : Variations des teneurs en Cu ²⁺ échangeable (µg g ⁻¹ MS) de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs et les astérisques représentent respectivement les écart-types (n=5) et les différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement (*p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001).	79
Figure 37 : Variations des teneurs en éléments trace métalliques : Cu et Zn (mg g ⁻¹ MS), Pb et Cd (µg g ⁻¹ MS) de l'horizon litière (L) et de l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha ⁻¹). Les barres d'erreurs et les astérisques représentent respectivement les écart-types (n=5) et les différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement (*p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001).	80
Figure 38 : Principaux processus impliqués dans la transformation des formes d'azote contenues dans les boues d'après Nicolardot <i>et al.</i> (2003) (modifiée).....	82
Figure 39 : Evolution des ETM dans les sols amendés par les boues	87
Figure 40 : Variations de la teneur en diverses formes d'azote minéral de la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur et les astérisques représentent respectivement les écarts-types (n=5) et les différences significatives entre le traitement B' et le témoin T' (*p<0,05)	94
Figure 41 : Variations de la teneur en diverses formes d'azote minéral de l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3). Les cercles noirs indiquent les valeurs mesurées dans l'eau de la source (S) située en bas de pente.	95
Figure 42 : Variations de la teneur en potassium de la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5).....	96
Figure 43 : Variations de la teneur en potassium de l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3). Les cercles noirs indiquent les valeurs mesurées dans l'eau de la source (S) située en bas de pente	96
Figure 44 : Variations de la teneur en éléments minéraux (Mg, Ca, Mn et Na) de la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur et les astérisques représentent respectivement les écarts-types (n=5) et les différences significatives entre le traitement B' et le témoin T' (*p<0,05)	97
Figure 45 : Variations de la teneur en éléments minéraux (Mg, Ca, Mn et Na) de l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3). Les cercles noirs indiquent les valeurs mesurées dans l'eau de la source (S) située en bas de pente.....	98
Figure 46 : Variations de la teneur en éléments traces métalliques (Zn, Cu, Pb et Cd) de la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5).....	99

Figure 47 : Variations de la teneur en ETM (Zn, Cu, Pb et Cd) de l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3). Les cercles noirs indiquent les valeurs mesurées dans l'eau de la source (S) située en bas de pente.	100
Figure 48 : Essai <i>Lemna minor</i> à J+7. De gauche à droite : lixiviats obtenus par l'apport de l'équivalent de 0, 0,4, 3, 10, 30 et 60 t MS ha ⁻¹ de boues de STEP.	102
Figure 49 : Courbe concentrations-réponses de l'essai d'inhibition de la croissance de <i>Lemna minor</i> (nombre de frondes) en 7 jours, sur les lixiviats (a) sans et (b) après ajustement de pH. Les lettres indiquent les différences significatives entre les différents traitements.....	102
Figure 50 : Taux moyen de (a) stimulation de la croissance et (b) de frondes vertes des lentilles d'eau exposées aux lixiviats. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5). Les lettres indiquent les différences significatives entre les différents traitements.....	103
Figure 51 : Variations de la longueur des tiges des mélèzes <i>Larix decidua</i> cultivés pendant 18 mois (Récolte R ₅) sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur et les astérisques représentent respectivement les écarts-types (n=5) et les différences significatives entre les traitements et le témoin (T) (*p<0,05)	114
Figure 52 : Variations de la hauteur de la tige et de la longueur des racines latérales des plants de mélèze <i>Larix decidua</i> cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le Témoin à * p<0,05, ** p<0,01 et *** p<0,001.	115
Figure 53 : Variations de la longueur moyenne des ramifications des plants de mélèze <i>Larix decidua</i> cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; * Différence significative avec le Témoin à p<0,05.	115
Figure 54 : Variations de la biomasse sèche des plants de mélèze <i>Larix decidua</i> cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin à * p<0,05, ** p<0,01 et *** p<0,001	116
Figure 55 : Evolution de RGR : valeurs moyennes des 5 plants entre deux dates de récolte non successives. Les barres d'erreur représentent les écarts-types ; ***Différence significative avec le témoin (T) à p<0,001	117
Figure 56 : Photographie d'une coupe transversale d'une tige de mélèze <i>Larix decidua</i> montrant les différents cernes de croissance	117
Figure 57 : Variations de la circonférence de la tige au niveau du collet entre des plants de mélèze <i>Larix decidua</i> cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin à *p<0,05 et **p<0,01.....	118
Figure 58 : Variations de la surface des cernes des plants de mélèze <i>Larix decidua</i> cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin à **p<0,0 et ***p<0,001	119
Figure 59 : Variations de la largeur des cernes au niveau du collet des plants de mélèze <i>Larix decidua</i> cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin à *p<0,05 et **p<0,01.....	119
Figure 60 : Variations de l'azote total dans (a) les aiguilles (A1) et (b) les racines latérales exprimée en %. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte	120
Figure 61 : Variations de la teneur totale en P exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte	121
Figure 62 : Variations de la teneur totale en K exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les	

	traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	122
Figure 63 :	Variations de la teneur totale en Mg exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	123
Figure 64 :	Variations de la teneur totale en Ca exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	124
Figure 65 :	Variations de la teneur totale en Mn exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	125
Figure 66 :	Variations de la teneur totale en Na exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	126
Figure 67 :	Variations de la teneur totale en Cu exprimée en µg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	127
Figure 68 :	Variations de la teneur totale en Zn exprimée en µg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	128
Figure 69 :	Variations de la teneur totale en Pb exprimée en µg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	129
Figure 70 :	Variations de la teneur totale en Cd exprimée en µg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	130
Figure 71 :	Variations de la concentration des éléments minéraux (a) P, (b) K, (c) Na, (d) Mg, (e) Ca et (f) Mn exprimée en mg g ⁻¹ MS dans les cernes formés pendant l'essai. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.	131
Figure 72 :	Variations de la concentration des éléments traces métalliques (a) Cu, (b) Zn, (c) Cd et (d) Pb exprimée en µg g ⁻¹ MS dans les cernes formés pendant l'essai. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les	

traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha ⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha ⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.....	132
Figure 73 : Variations de l'activité nitrate réductase exprimée en µg (NO ₂) g ⁻¹ MF h ⁻¹ dans les aiguilles A1 et les racines latérales des plants de mélèze (<i>Larix decidua</i>) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin (T) à *p<0,05 et ***p<0,001.....	133
Figure 74 : Variations de l'activité superoxyde dismutase (SOD) exprimée en U mg ⁻¹ de protéines dans les aiguilles (A1) et les racines latérales (R1) des plants de mélèze (<i>Larix decidua</i>) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; *Différence significative avec le témoin (T) à p<0,05.....	134
Figure 75 : Variations de l'assimilation nette de CO ₂ exprimée en µmol m ⁻² s ⁻¹ des plants de mélèze (<i>Larix decidua</i>) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par les boues de STEP de juin à septembre. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les 4 campagnes de mesures de chaque traitement (n=5) et de chaque année.....	135
Figure 76 : Variations de la teneur en chlorophylle a et b des plants de mélèze (<i>Larix decidua</i>) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; **Différence significative avec le témoin (T) à p<0,01.....	136
Figure 77 : La relation entre la circonférence et la hauteur des plants de mélèze <i>Larix decidua</i> témoins (T) et amendés (B) par des boues de STEP.....	137
Figure 78 : Cartographie des zones homogènes définies en fonction des données dendrométriques et pédologiques de la parcelle.....	138
Figure 79 : Variations des teneurs en phosphore (µg g ⁻¹ MS) dans des cernes mis en place de 2007 à 2010 par les mélèzes amendés (B') et non amendés (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types.....	139
Figure 80 : Variations des teneurs en phosphore (µg g ⁻¹ MS) dans des cernes mis en place de 2007 à 2010 par les mélèzes amendés (B') et non amendés (T') de la zone sud-ouest définie comme homogène. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.....	139
Figure 81 : Variations de la richesse spécifique dans les parcelles amendées avec l'apport de 0,4 t MS de boues liquides (B) et dans les parcelles témoins non amendées (T). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3) ; Différence significative avec le témoin à *p<0,05.....	141
Figure 82 : Variations des teneurs en azote (mg g ⁻¹ MS) des aiguilles de mélèze <i>Larix decidua</i> témoin (T') et amendé (B') par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=12).....	143
Figure 83 : Variations des teneurs en EM (P, K, Mg, Mn, Ca et Na), exprimées en mg g ⁻¹ MS, des aiguilles de mélèze <i>Larix decidua</i> témoin (T') et amendé (B') par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=12).....	144
Figure 84 : Variations des teneurs en ETM (Cu, Zn, Pb et Cd), exprimées en µg g ⁻¹ MS, des aiguilles de mélèze <i>Larix decidua</i> témoin (T') et amendé (B') par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=12).....	144
Figure 85 : Variations des teneurs en EM (P, K, Mg, Mn, Ca et Na), exprimées en mg g ⁻¹ MS, des carpophores récoltés dans les placettes témoins (T) et amendées (B) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=10).....	145
Figure 86 : Variations des teneurs en ETM (Cu, Zn, Pb et Cd), exprimées en µg g ⁻¹ MS, des carpophores récoltés dans les placettes témoins (T) et amendées (B) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=10).....	145
Figure 87 : Les plants de mélèzes <i>Larix decidua</i> à 3 mois de culture sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP.....	148
Figure 88 : Variations des teneurs en ETM accumulées dans le corps mou des escargots exposés durant 14 et 28 jours à des sols amendées (B' en bleu claire) et non amendés (T' en vert). Aucune différence significative n'a été observée. Ainsi, les valeurs ont été cumulées (n=18 pour B' et n=12 pour T'). Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. * différence significative entre les traitements T' et B' d'un même prélèvement (*p<0,05, test t) et # différence significative par rapport à t0 (test de Tukey).....	160
Figure 89 : Variations de la biomasse sèche exprimée en g des escargots placés dans les mésocosmes des SP amendées (B') et non amendés (T') après 14 et 28 jours d'exposition. Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test t) et entre les prélèvements (test de Tukey).	162

Figure 90 : Variations de la masse de la coquille exprimée en g des escargots placés dans les mésocosmes des SP amendées (B') et non amendées (T') après 14 et 28 jours d'exposition.....	162
Figure 91 : Représentation schématique des voies de transfert des ETM dans le continuum sol-plante-escargot (les flèches en tirets indiquent les voies de transfert faible ou nulle, selon l'épaisseur, les flèches continues indiquent l'importance du transfert).....	165
Figure 92 : Représentation schématique des mécanismes d'accumulation et d'élimination des ETM durant l'exposition (les flèches en tirets et continues indiquent respectivement les mécanismes faibles et importants, le rond indique les variations des quantités assimilées durant l'exposition)	166
Figure 93 : Lettuce plants grown on soil amended with increasing doses of sewage sludge (A: 0 (control), B: 3, C: 30 and D: 60 Mg DW ha ⁻¹). The effect of SS on lettuce growth can be seen in differences of the development of the above-ground parts in each treatment	172
Figure 94 : Fresh (a) and dry (b) weight of the whole soft bodies of exposed <i>Cantareus aspersus</i> to control (CS) or amended soil (AS) and fed with control (CL) or amended lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha ⁻¹ . GR: Estimated growth rate (g snail ⁻¹ d ⁻¹) for n=3 with 4 sub-replicates. GR values that share similar letters are not significantly different (p<0.05). In the same treatment, p indicates the result of statistical test during exposure period (0, 7, 14, 28 days).	173
Figure 95 : Relationships between shell diameter (mm) with (a) fresh mass (g) of the whole soft bodies or with (b) shell mass (g) of <i>Cantareus aspersus</i> during exposure to control (CS) or amended soil (AS) and fed with control (CL) or amended lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha ⁻¹ . In the same treatment, p indicates the result of statistical test during exposure period (0, 7, 14, 28 days).....	174
Figure 96: Total contents (µg snail ⁻¹) of essential elements: (a) Cu and (b) Zn calculated in the whole soft bodies of exposed <i>Cantareus aspersus</i> to control (CS) or amended soil (AS) and fed with control (CL) or amended lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha ⁻¹ . a= assimilation fluxes (µg metal snail ⁻¹ d ⁻¹) for n=3 with 2 sub-replicates. Values that share similar letters are not significantly different (p<0.05). In the same treatment, p indicates the result of statistical test during exposure period (0, 7, 14, 28 days)	175
Figure 97 : Total contents (µg snail ⁻¹) of non-essential elements: (a) Pb and (b) Cd calculated in the whole soft bodies of exposed <i>Cantareus aspersus</i> to control (CS) or amended soil (AS) and fed with control (CL) or amended lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha ⁻¹ . a= assimilation fluxes (µg metal snail ⁻¹ d ⁻¹) for n=3 with 2 sub-replicates. Values that share similar letters are not significantly different (p<0.05). In the same treatment, p indicates the result of statistical test during exposure period (0, 7, 14, 28 days)	176

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gisement de boues dans certains pays de l'UE (d'après Buffet, 2010).....	31
Tableau 2 : Teneurs limites réglementaires en éléments-traces métalliques des sols et des boues d'épuration municipales dans l'Union Européenne et en France (en mg kg ⁻¹ de MS) :	36
Tableau 3 : Les différents sites d'épandage en Franche-Comté	45
Tableau 4 : Les caractéristiques physico-chimiques du sol (horizon de surface).....	48
Tableau 5 : Les caractéristiques physico-chimiques des boues épandues	48
Tableau 6 : calculs des volumes de boues appliqués aux pots selon les modalités	54
Tableau 7 : Indications du % d'enrichissement du sol et de l'équivalent apporté en N et P.....	54
Tableau 8 : Evolution du pH des résidus de boues formés à la surface du pot (moyenne± écart-type ; n=5) ; ***Différence significative à p<0,001 entre B1 et B2.	67
Tableau 9 : Teneurs en % d'azote des résidus de boues (Rb) formés en surface du pot (moyenne± écart-type ; n=5). Pour la même récolte, les moyennes de B1 et B2 qui sont différentes significativement sont marquées par des astérisques (** p<0,01 et *** p<0,001).	69
Tableau 10 : Effet de l'apport de boues sur la dynamique du rapport C/N (moyenne± écart-type ; n=5). Pour la même récolte, les astérisques représentent les différences significatives des traitements avec le témoin (*p<0,05 ; ** p<0,01 et *** p<0,001).	69
Tableau 11 : Teneurs en P total des résidus de boues formés en surface du pot (mg g ⁻¹ MS) (moyenne± écart-type ; n=5) ; ***Différences significative entre B1 et B2 de la même récolte à p<0,001.	70
Tableau 12 : Teneurs en K total des résidus de boues formés en surface du pot (mg g ⁻¹ MS) (moyenne± écart-type ; n=5)	71
Tableau 13 : Teneurs en Mg, Mn, Na et Ca des résidus de boues formés en surface du pot (mg g ⁻¹ MS) (moyenne± écart-type ; n=5)	72
Tableau 14 : Teneurs en cuivre échangeable des résidus de boues formés en surface du pot (µg g ⁻¹ MS) (moyenne± écart-type ; n=5). Les astérisques représentent les différences significatives entre les traitements comparés au témoin pour la même récolte (*p<0,05 ; **p<0,01 et ***p<0,001).	73
Tableau 15 : Teneurs en ETM des résidus de boues formés en surface du pot (µg g ⁻¹ MS) (moyenne± écart-type ; n=5). Pour la même récolte, les astérisques représentent les différences significatives entre les traitements (*p<0,05 ; ** p<0,01 et *** p<0,001).	75
Tableau 16 : pH des lixiviats avant le lancement du bio-essai (n=5)	101
Tableau 17 : Teneurs en éléments minéraux et éléments traces métalliques des différents lixiviats (moyenne±écart-type ; n=5). Les lettres indiquent les différences significatives entre les différents apports de boues	104
Tableau 18 : Variations de l'assimilation nette de CO ₂ (moyenne ± écart-type) exprimée en µmol m ⁻² s ⁻¹ des plants de mélèze (<i>Larix decidua</i>) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par les boues de STEP. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements B1 et B2 comparés au témoin T.	135
Tableau 19 : Variations du potentiel hydrique (moyenne ± écart-type) exprimé en MPa des plants de mélèze (<i>Larix decidua</i>) selon les différentes durées de culture sur sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP.....	136
Tableau 20 : Fiche du relevé floristique réalisé en été 2008 ; 0 à 5 : classes d'abondance-dominance.	140
Tableau 21 : Fiche du relevé floristique réalisé en été 2009 ; 0 à 5 : classes d'abondance-dominance.	140
Tableau 22 : Fiche du relevé floristique réalisé en été 2010 ; 0 à 5 : classes d'abondance-dominance.	141
Tableau 23 : Fiche du relevé floristique réalisé en été 2010 dans les SP B' et T'	142
Tableau 24 : Abondance relative de chaque espèce présente sur les SP en %	142
Tableau 25 : Concentrations des ETM (moyenne ± écart-type) (µg g ⁻¹ MS) dans les racines latérales et les aiguilles des plants de mélèze <i>Larix decidua</i> cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha ⁻¹ et B2: 60 t MS ha ⁻¹) par des boues de STEP. Les lettres signalent les différences significatives entre les traitements (p<0,05, test de Tukey). nd : inférieur à la limite de détection. ..	152
Tableau 26 : Concentrations optimales et toxiques des ETM (µg g ⁻¹ MS) dans les feuilles des plantes (D'après Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Alloway, 1995)	152
Tableau 27 : Récapitulatif de l'évolution de certains paramètres durant les récoltes (→:pas d'effet ; ↗, ↗↗ et ↗↗↗ : degré de l'augmentation, - : pas de mesure)	155
Tableau 28 : Teneurs moyennes en ETM dans la litière non amendées (LT') et amendées (LB') et dans le sol sous-jacent non amendées (ST') et amendées (SB') (moyenne ± écart-type) (n=6 à 9). Les lettres signalent les différences significatives entre les traitements (p<0,05, test t).....	159

Tableau 29 : Teneurs moyennes en ETM des plantes prélevées dans les mésocosmes des SP amendées (B') et non amendées (T') (moyenne \pm écart-type) (n=6 à 9). Les lettres signalent les différences significatives entre les traitements (p<0,05, test t).....	159
Tableau 30 : Biomasse fraîche totale (g) des escargots placés dans les mésocosmes des SP amendées (B') et non amendés (T') après 14 et 28 jours d'exposition. Les astérisques (***) indiquent une différence significative entre le prélèvement à 28 jours comparé avec celui du 14 ^{ème} jour (p<0,001, test t) et les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes entre les traitements d'un même prélèvement.	161
Tableau 31 : Teneurs limites et teneurs moyennes en ETM des sols	163
Tableau 32 : Characteristics of soil and sewage sludge used in the experiment.	169
Tableau 33 : Mean (\pm SD) TMs concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) in control soil (CS) and amended soil (AS) with 3, 30 and 60 Mg DW ha ⁻¹ (n=3). For each metal, values that share similar letters are not significantly different (p<0.05).	171
Tableau 34 : Mean (\pm SD) TMs concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW), mineral elements and protein (mg g ⁻¹ DW) in lettuce leaves used to feed <i>Cantareus aspersus</i> snails. Leaves were sampled from plants grown on soil control: Control Lettuce (CL) and amended soil: Amended Lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha ⁻¹ (n=3). For each element, values that share similar letters are not significantly different (p<0.05).	172

Liste des annexes

Annexe 1 : Législation flamande (Smit, 1998 cité par Baize et Tercé, 2002).....	191
Annexe 2 : Législation aux Pays-Bas (Smit, 1998 cité par Baize et Tercé, 2002).....	192
Annexe 3 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution des paramètres du sol en fonction de la durée de culture (Rb : Résidus de boues, H> : horizon supérieur et H< : horizon inférieur des pots témoins (T), des pots amendés B1 (30 t MS ha ⁻¹) et B2 (60 t MS ha ⁻¹).	193
Annexe 4 : Distances d'isolement des points d'eau lors des épandages des boues de STEP (Arrêté du 8 janvier 1998)	194
Annexe 5 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution des teneurs en EM et ETM des organes en fonction de la durée de culture : (A0 : aiguilles anciennes A1 : aiguilles néoformées, RAM : ramifications, TP : tige principale, RP : racine pivot et RL : racines latérales. T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha ⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha ⁻¹ de boues de STEP).	195
Annexe 6 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution de la biomasse sèche de la partie aérienne et racinaire, le % d'azote dans les aiguilles et les racines latérales en fonction de la durée de culture (T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha ⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha ⁻¹ de boues de STEP).....	196
Annexe 7 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution de la hauteur de la tige en fonction de la durée de culture (T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha ⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha ⁻¹ de boues de STEP)	196
Annexe 8 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution du taux de croissance relative (RGR) en fonction de la durée de culture (T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha ⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha ⁻¹ de boues de STEP).	196
Annexe 9 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution des teneurs en EM et ETM dans les différents cernes (T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha ⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha ⁻¹ de boues de STEP).....	197
Annexe 10 : Evaluation of municipal sewage sludge impacts on forest ecosystems: benefits and risks. Integrated Water Resources Management and Challenges of the Sustainable Development, 24-26 March 2010. Agadir (Maroc).....	198
Annexe 11 : Effects of paper mill sludge on soil properties and on growth and nitrogen content of sunflower (<i>Helianthus annuus</i>). Integrated Water Resources Management and Challenges of the Sustainable Development, 24-26 March 2010. Agadir (Maroc).....	199
Annexe 12 : Growth and trace elements accumulation responses of snails (<i>Helix aspersa</i>) exposed to sewage sludge in forest ecosystem. Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 22 juin 2011. Paris, France.....	200
Annexe 13 : Les réponses écotoxicologiques des escargots <i>Cantareus aspersus</i> exposés à des sols amendés par les boues urbaines. 4ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA, Saint Lager, 7-9 Novembre 2011.	201
Annexe 14 : Evaluation of sewage sludge effects on soil properties, plant growth, mineral nutrition state and heavy metal distribution in European larch seedlings (<i>Larix decidua</i>)	202

Glossaire des abréviations

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
AFOCEL : Association forêt cellulose
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AR : Abondance relatif
CEMAGREF : Centre national du machinisme agricole, du génie rural, des eaux et des forêts, devenu : Irstea : Institut de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture.
CTO : Composés traces organiques
DW : Dry weight
Eh : Potentiel REDOX
EM : Eléments minéraux
ERESFOR : Epanrages de produits résiduaire sur parcelles boisées
ETM : Eléments traces métalliques
HAP : Hydrocarbures aromatique polycycliques
HR : Humidité relative
ICP-AES : Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
IDF : Institut pour le Développement Forestier
INRA : Institut national de la recherche agronomique
ISO : International Organization for Standardization
MF : Masse fraîche
MO : Matière organique
MS : Masse sèche
NR : Nitrate réductase
ONF: Office national des forêts
ORDIF: Observatoire régional des déchets d'Île de France
PCB : Polychlorobiphényles
pH : Potentiel hydrogène
RGR : *Relative growth rate*
RITTMO : Recherche Innovation et Transfert de Technologie pour les Matières fertilisantes Organiques et l'agroenvironnement
SAA : Spectromètre d'absorption atomique
SCP : Société du canal de Provence
SOD : Superoxyde dismutase
STEP : Station d'épuration
TCR : Taillis à courte rotation
TtCR : Taillis à très courte rotation

INTRODUCTION

GENERALE

Le traitement des eaux usées domestiques au sein de stations d'épuration (STEP) génère d'un côté, un effluent liquide d'une qualité convenable qui peut être rejeté dans les eaux de surface avec un impact minimal sur l'environnement ou sur la santé publique, et de l'autre côté, un résidu sous forme de boues considéré comme un déchet depuis 1998, et qui était jusqu'à présent utilisé comme source de macro- et micronutriments pour les sols agricoles. Cet usage, particulièrement réglementé et suivi en France depuis une vingtaine d'année, se heurte aujourd'hui à des réticences de la part des agriculteurs soutenus par l'opinion publique car les boues de STEP contiennent également des Composés Traces Organiques (CTO) et des Eléments Traces Métalliques (ETM) qui, par leur nocivité pour les systèmes vivants, pourraient bien contrebalancer l'effet bénéfique d'un apport de nutriments. De plus, ces composés présentent le risque de se répandre dans l'ensemble de l'écosystème par le jeu des chaînes trophiques et d'atteindre et de contaminer la nappe phréatique à la suite de phénomènes de lixiviation.

Une solution alternative à l'épandage agricole, déjà utilisée dans plusieurs pays européens mais en phase expérimentale en France, consisterait à épandre ces boues en parcelles boisées. Les débouchés non alimentaires des produits forestiers permettraient en effet de minimiser les risques de contamination humaine. De plus, les sols « forestiers » étant dans la majeure partie des cas des sols pauvres, un apport de matière fertilisante pourrait permettre d'améliorer la productivité des parcelles. **Thomas *et al.* (2004)** a suggéré que 1 % de la superficie forestière devrait être théoriquement suffisante pour appliquer 50 % des boues à un taux de $3 \text{ t MS ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. Cependant, cette alternative a été envisagée en pratique pour les taillis à courte rotation (TCR) ou très courte rotation (TtCR). En effet, l'application des boues aux plantations forestières pourrait potentiellement augmenter la croissance des arbres et la production du bois (**Henry et Cole, 1997 ; Mosquera-Losada *et al.*, 2001**). Ainsi, les boues peuvent être considérées comme une source de phosphore (P), d'azote (N), de matière organique et de micronutriments (**Ferrier *et al.*, 1996 ; Bramryd 2001**). Cependant, la possibilité de contamination par les CTO et les ETM évoquée précédemment doit, néanmoins là encore, être prise en considération et il s'avère donc nécessaire d'évaluer le rapport entre le bénéfice tiré de l'amendement et le risque, constitué par ces composés, pour l'ensemble des composantes de l'écosystème.

L'objectif principal de ce travail de recherche est d'évaluer les bénéfices et les risques associés à l'épandage de boues sur le mélèze. Deux approches complémentaires ont été menées. D'une part, une approche terrain qui a été réalisée sur une plantation de mélèze âgée

de 10 ans. D'autre part, les résultats terrain ont été complétés par des expérimentations en conditions contrôlées.

Le manuscrit de thèse est organisé en 4 chapitres précédés d'une **synthèse bibliographique** qui présente l'état de l'art relatif à la problématique de recherche définie et de la partie « **Matériels et méthodes** » qui décrit de manière détaillée les techniques expérimentales utilisées pour réaliser cette étude. La dernière partie de mémoire sera réservée aux conclusions générales et aux perspectives.

- Dans le **chapitre I**, nous présentons l'impact des boues sur les propriétés physico-chimiques du sol et sur le comportement des différents éléments (N, P, K, ETM...) dans le profil du sol.
- Le **chapitre II** s'intéresse à l'évaluation de l'impact des boues sur les ressources hydriques. Ce chapitre renferme également l'étude de l'effet des lixiviats sur les lentilles d'eau.
- Dans le **chapitre III**, nous avons analysé les effets des boues sur le statut nutritionnel des mélèzes et son effet sur la croissance, ainsi que sur le transfert et l'accumulation des ETM. Dans la partie terrain de ce chapitre, nous exposons l'effet sur la biodiversité du sous-bois et la bioaccumulation des ETM par les champignons.
- Le **chapitre IV** est consacré à l'étude de l'impact des boues sur l'escargot comme bio-indicateur de la contamination le long de la chaîne trophique.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. GENERALITES

Les déchets, un problème de poids pour l'ensemble de la planète. Si la question de gestion des déchets est récente, la notion de déchet remonte à l'antiquité. Suite à la naissance des agglomérations, la production des déchets augmente. Ainsi, à Paris par exemple, les résolutions de se débarrasser des déchets se sont succédées : endiguer « la marée montante des ordures » en 1184, taxe des « boues et lanternes » en 1506, taxe de « balayage » et naissance de « poubelle » en 1883 (**Barles, 2005**). L'industrialisation et l'urbanisation caractéristiques des deux derniers siècles ont conduit à une augmentation des quantités de déchets produites. En 1975, la loi confie aux collectivités locales la responsabilité de les collecter, les traiter ou les stocker. Les dépôts sauvages et les problèmes de pollution aboutissent à la modification de cette loi en 1992 et font émerger une volonté de valorisation de ces matières longtemps destinées à l'abandon (**Réf. Internet 1**). La complémentarité entre ville, industrie et agriculture s'est traduite par le bouclage des cycles de matières.

En France, la production de déchets et des eaux usées ne cesse d'augmenter et les préoccupations de leurs devenir grandissent. Les traitements des eaux usées réalisés en station d'épuration consistent à dégrader et séparer les polluants de l'eau (particules, substances dissoutes, microorganismes) par des procédés physiques, chimiques et biologiques pour ne restituer au milieu aquatique qu'une eau de qualité suffisante. Le résultat de ces opérations est la production de boues qui est le principal sous-produit du cycle de traitement de l'eau. Elles se présentent sous des aspects variables, allant de la forme liquide à une matière totalement déshydratée. Trois modes sont actuellement retenus dans l'élimination et la valorisation des boues émises par les stations d'assainissement. L'incinération qui n'est pas sans risque (cas des rejets diffus de dioxines) et n'est pas forcément bien acceptée par les populations. De plus, les impacts des rejets gazeux potentiellement polluants n'ont pas fait l'objet de beaucoup de travaux scientifiques (**Tercé, 2003 ; ORDIF, 2003**). Le deuxième mode, qui est la mise en décharge, est réservé, depuis juillet 2002, aux boues présentant des caractéristiques de dangerosité (boues provenant du traitement in situ des effluents contenant des substances dangereuses : industrie de textile, pétrole, chimie minérale, organique, pharmaceutique...). L'épandage agricole, qui s'appuie sur la valeur fertilisante de ce sous-produit, est le mode d'élimination et de valorisation le plus ancien (**Figure 1**). En France, l'impact de la politique européenne en matière de traitement des eaux usées se traduit par une augmentation de la production des boues (**Figure 2**) qui a atteint 1.166.048 de tonnes de matières sèches en 2008 (**Legroux et al., 2009**). Au niveau européen (**Tableau 1**), la production de boues est constante. Elle est d'environ 10 millions de tonnes de matières sèches dont 39 % sont recyclés par l'agriculture (**Ferstler, 2010**).

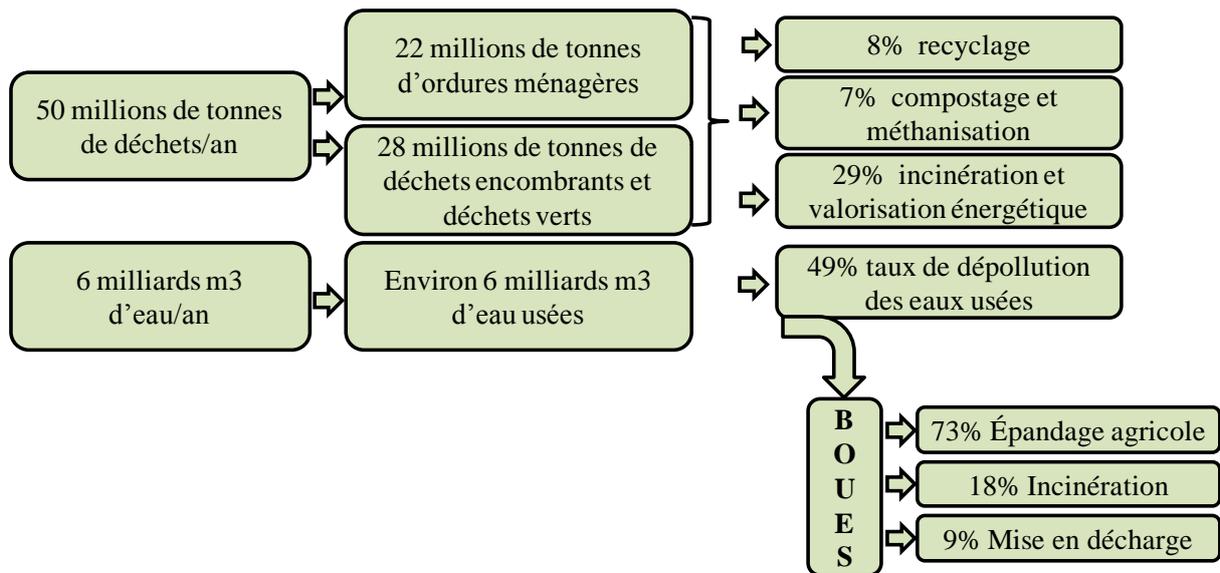


Figure 1 : La production de déchets et les voies d'élimination et de valorisation en France (Barles, 2005 ; Legroux *et al.*, 2009 modifiée).

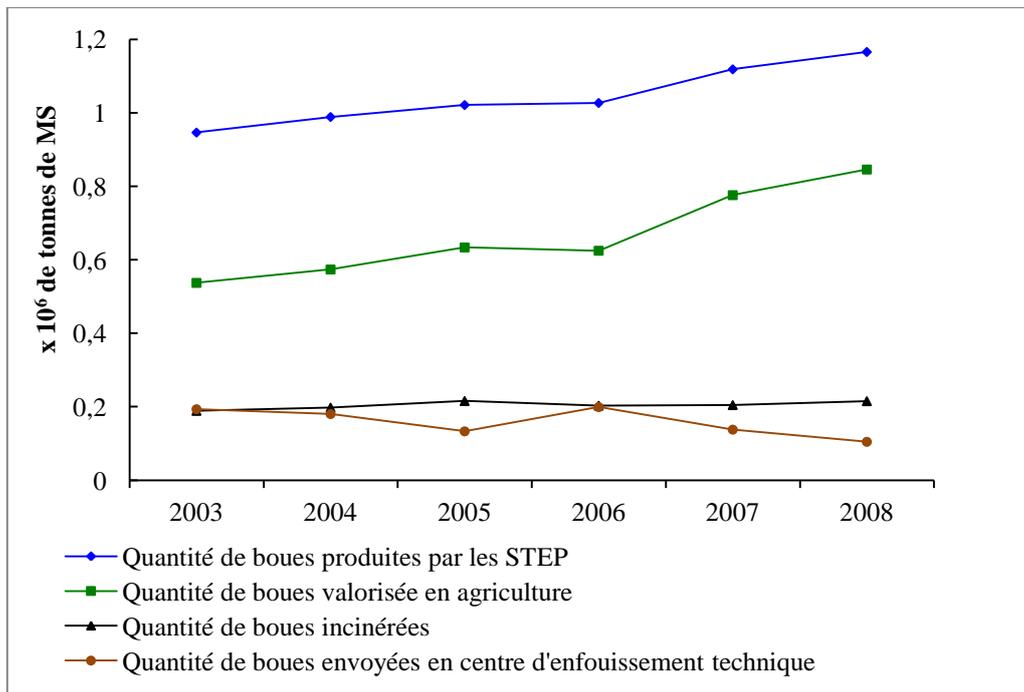


Figure 2 : Evolution des voies d'élimination des boues de STEP en France et parallèle à la production (2003-2008) (d'après Legroux *et al.*, 2009).

Tableau 1 : Gisement de boues dans certains pays de l'UE (d'après Buffet, 2010)¹: Population en 2009, d'après Eurostat « Demography report 2010 » (Réf. Internet 2)²: moyenne de 2004-2005-2006

Pays UE 14	Population ¹	Gisement		Recyclage en agriculture			
		Année et tendance	t de MS	Année et tendance	t de MS	%	
Allemagne	82 002 356	Stable ²	2 090 674	décroissant ²	643806	31	
Autriche	8 355 260	2005	266 100	2005	47190	18	
Belgique	10 753 080	Flandres	Croissant ²	91 865,5	décroissant ²	26948	32
		Wallonie	2007	31 380	2007	10927	35
Danemark	5 511 451	2002	140 021	2002	82029	59	
Espagne	45 828 172	Stable ²	1 018 791	stable ²	659200	65	
Finlande	5 326 314	2004-2005	148 800	2004-2005	7900	5	
France	64 366 894	2007	1 125 000	stable ²	787500	70	
Grèce	11 260 402	Croissant ²	108 726	croissant ²	41	0	
Irlande	4 450 030	2003	42 147	2003	26743	63	
Italie	60 045 068	Croissant ²	1 038 320	stable ²	200153	19	
Pays Bas	16 485 787	2003	550 000	2003	34	0	
Portugal	10 627 250	2002	408 710	2002	189758	46	
Royaume Uni	61 595 091	Croissant ²	1 500 337	stable ²	986834	66	
Suède	9 256 347	Stable ²	210 000	croissant ²	25000	12	
Total	395 863 502	Total	8770872	Total	3694063	42	

2. EPANDAGES DE BOUES D'EPURATION URBAINES SUR DES TERRES AGRICOLES

L'épandage de boues de stations d'épuration en agriculture est une pratique largement répandue dans le monde. Tel qu'il est pratiqué actuellement, il s'inscrit dans la longue histoire des techniques d'épuration des eaux usées et de valorisation agricole des résidus produits. Cette histoire montre aussi la permanence des conflits, qui engendrent des décisions politiques traduites en textes, menant à la conception de techniques nouvelles comme à des règles d'usage des résidus. Les boues ont été considérées comme un « **intrant** » agricole jusqu'aux années 1980. Au début des années 1990, cet intrant est transformé en « **risque** ». Cependant, en 1997, ces boues acquiert un nouveau statut, celui de « **déchets** » avec la mise en place du décret de décembre 1997 et de son arrêté de son application de janvier 1998 (**Tercé, 2003**). Chaque débat engagé autour des boues et leur devenir, la question sanitaire et les inquiétudes environnementales sont évoqués. Pourtant, l'épandage des boues en agriculture s'avère un moyen de recycler des éléments nutritifs en vue de fertiliser le sol. Toutefois leur emploi peut poser des problèmes de qualité des sols si les éléments indésirables (ETM, CTO et pathogènes) qu'elles contiennent ne sont pas contrôlées et maîtrisées (**Juste et al., 1995**).

2.1. LES BENEFICES

2.1.1. LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU SOL

La valorisation des boues de station d'épuration en agriculture peuvent remplacer ou réduire l'utilisation excessive des engrais commerciaux. **Tsadilas et al. (1995)** et **Nèble et al. (2007)** ont signalé une augmentation du pH du sol tandis que le contraire a été démontré par

Epstein et al. (1976) et **Kassaoui et al. (2009)**. Une étude de **Parkpain et al. (2000)** restreint cette augmentation du pH aux sols acides alors qu'aucun changement n'a été observé pour les sols neutres. D'après **Mahdavi et al. (2010)**, une augmentation du pH du sol entraîne une diminution de la mobilité des ETM. Ainsi, des apports inconsiderés de boues peuvent perturber les propriétés du sol. A long terme, l'apport de boues, riche en matière organique, améliore la fertilité du sol (**Archie et Smith, 1981**), la densité, la porosité et la capacité de rétention d'eau (**Singh et Agrawal, 2008**).

2.1.2. LES PROPRIETES MICROBIENNES ET ENZYMATIQUES DU SOL

L'activité enzymatique est considérée comme un indicateur de la fertilité des sols. Les enzymes, synthétisées par les micro-organismes et les racines des plantes, catalysent d'importantes réactions jouant un rôle clé dans le processus de minéralisation de la matière organique (**Reddy et al., 1987; Singh et al., 2008**). L'apport des boues augmente la densité et l'activité microbienne (i.e. bactéries et champignons) (**Nèble et al., 2007**), la respiration (**Carbonell et al., 2009**) et l'activité enzymatique du sol (**Banerjee et al., 1997**). Toutefois, cette activité est réduite ou même inhibée dans des sols ayant reçu des boues riches en ETM (**Fliessbach et al., 1994, Singh et al., 2008**).

2.1.3. LES ELEMENTS MINERAUX

La valorisation des boues d'épuration en agriculture est une pratique ancienne. Elle permet le recyclage des éléments fertilisants tels que la matière organique, l'azote, le phosphore et de nombreux éléments minéraux pour la plante (**Sommers, 1977; Bailly et al., 2004; Hussein et al., 2010**). Les teneurs en macroéléments tels que N, P et K vont assurer une partie des besoins des plantes, ainsi, plusieurs auteurs ont montré que la croissance des plantes a été améliorée sensiblement après application de boues (**Reed et al., 1991 ; Saruhan et al., 2010**). En effet, une disponibilité élevée en azote pour les plantes stimule le développement et l'activité racinaires, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux (**Bipfubusa et al., 2006**). L'azote est aussi un élément constitutif de la molécule de chlorophylle et des protéines des systèmes photosynthétiques. Son augmentation induirait une stimulation de l'activité photosynthétique ainsi que celle de la production de biomasse.

D'après **Benbrahim et al., (2003)**, L'épandage de 3 t ha⁻¹ de matières sèches (boues liquides) correspond à un apport d'environ 200, 200, et 45 unités de N, P et K, respectivement. **Sikora et Enkiri (1999)** suggèrent que les boues de STEP puissent remplacer un tiers d'engrais azotés sans diminuer le rendement.

Divers facteurs influencent la disponibilité des boues en azote : la quantité d'azote inorganique, le processus de digestion (anaérobie vs aérobie), le ratio C/N, le pH, le mode et la saison d'application ainsi que les propriétés physico-chimiques du sol récepteur. Dans le cas du P, la disponibilité est plus variable que celle de N. Les conditions du sol et les caractéristiques des boues influencent le processus de minéralisation. Sa disponibilité aux cultures est réduite par la disponibilité des minéraux ou bien des métaux du sol tels que Fe, Al, Mn et Ca. Les ions P précipitent principalement avec Fe, Al, and Ca. Dans les sols acides, les ions P précipitent avec le Fe et l'Al, tandis qu'à pH neutre, ils précipitent avec le Ca pour former divers phosphates de calcium (**Lindsay et al., 1989**). **Sinaj et al. (2002)** montre que le

facteur principal contrôlant l'utilisation à court terme du P provenant de boues d'épuration par une plante est la teneur en Pi rapidement échangeable. A l'inverse du cas de N et P, le K n'est pas lié organiquement, ainsi il n'est pas soumis aux réactions de minéralisation (**Warman et al., 2005a**). De plus, les boues n'apportent que très peu de K par rapport au stock initialement présent dans le sol (1 à 2 %) (**Benbrahim et al., 2003**). Bien que ces éléments (NPK) soient indispensables pour la croissance des végétaux, un apport excessif peut présenter un risque de contamination de l'ensemble de l'écosystème. Celui-ci peut s'opérer via l'eau, soit par lessivage vers les couches inférieures du sol puis vers la nappe phréatique, soit par ruissellement des eaux de surface entraînant ainsi une eutrophisation du milieu (**Thomas et al., 2004**) (**Figure 3**).

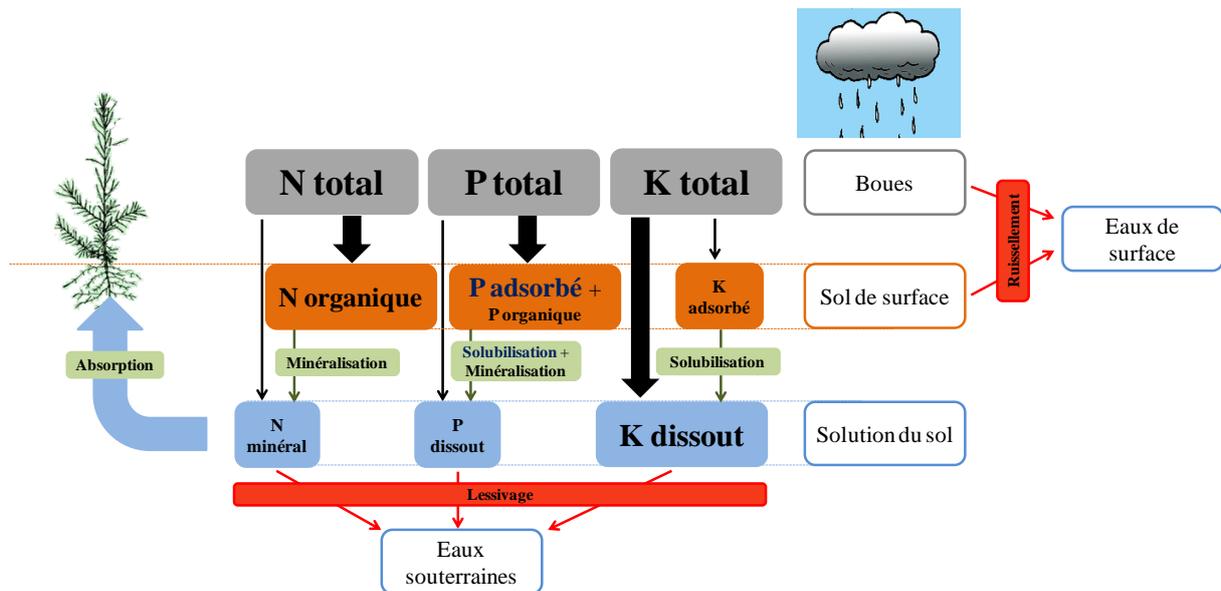


Figure 3 : Schéma illustratif du comportement et du devenir des éléments : N, P et K après épandage de boues.

Enfin, les boues de stations d'épuration contiennent aussi d'autres éléments minéraux (bore, manganèse, aluminium, calcium ...). Ces différents éléments sont souvent indispensables au développement des végétaux même si les besoins des végétaux sont très faibles. Néanmoins, certains éléments peuvent s'avérer toxiques pour les végétaux s'ils sont présents en grandes quantités dans les sols (**Bailly et al., 2004**).

2.2. LES RISQUES

Le développement de l'industrie, le ruissellement des eaux pluviales déversées directement dans les égouts et le changement de mode de consommation aboutissent au chargement des boues en ETM (**Smith, 1992**), en composés traces organiques (CTO) et en microorganismes pathogènes (**ORDIF, 2003**). Ces constituants des boues sont à l'origine des risques potentiels sur l'environnement et ce sont ceux liés à la présence des ETM qui ont été les mieux étudiés. Toutefois, l'azote et le phosphore pourraient constituer également un risque considérable essentiellement pour le compartiment eau où leur présence à des fortes concentrations peut générer des phénomènes d'eutrophisation.

La quantité de boues à épandre doit être calculée sur la base des exigences des cultures pour d'éviter tout risque potentiel. Bien que 50 à 90% de l'azote présent dans les boues est

organique (Sommers, 1977; Hernandez *et al.*, 2002), il est nécessaire de prendre en compte la vitesse de minéralisation car la disponibilité en N en est étroitement liée (Hernandez *et al.*, 2002). Une minéralisation rapide affecte le cycle naturel de l'azote et augmente la part de N minéral, ce qui n'est pas sans conséquence sur l'environnement et la santé.

2.2.1. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

Certains de ces ETM sont des oligo-éléments (Ni, Mn, Zn et Cu) indispensables au déroulement des processus biologiques, tandis que d'autres, tels que le plomb ou le cadmium, n'ont pas de fonction biologique connue. Bien qu'ils soient naturellement présents dans la croûte terrestre, les apports exogènes représentent un risque de contamination des sols, des cultures et de la chaîne alimentaire (Chaney, 1990 ; Thomas *et al.*, 2004). Toutefois, ces boues ne représentent qu'une faible part (1%) des effluents et déchets épandus en agriculture et que les apports en polluants restent faibles comparés à d'autres vecteurs tels que les engrais, les produits phytosanitaires, les déchets agricoles ou encore les retombées atmosphériques (Tercé, 2003 ; Muchuweti *et al.*, 2006).

Alors qu'une part de ces éléments présents dans les boues d'épuration est soumise à la lixiviation et au ruissellement. La part majeure des ETM tels que Zn, Ni, Cu et Cd peut persister dans le sol pendant une longue période et pourrait être absorbée et bioaccumulée par les plantes et entraîner ainsi une phytotoxicité. Des concentrations élevées d'ETM ont été signalées dans des sols amendés et des plantes cultivées sur ces sols (Hernandez *et al.*, 1991, Juste *et al.*, 1995). Le flux d'ETM vers les niveaux inférieurs de la chaîne trophique reste le principal facteur contrôlant la contamination de la chaîne alimentaire. Scheifler *et al.* (2003) rapportent que le risque potentiel de contamination de la chaîne alimentaire est important avec l'augmentation des ETM dans les tissus des organismes exposés. L'accumulation excessive d'ETM dans les sols agricoles conduit à une contamination des plantes cultivées qui pose un sévère problème de sécurité alimentaire (Muchuweti *et al.*, 2006). L'immobilité des ETM dans la couche labourée dépend étroitement du pH du sol et de la teneur en MO. La teneur en MO permet l'immobilisation des ETM dans le compartiment du sol. De cette façon, elle affecte la disponibilité des ETM pour les plantes (Martin et Coughtrey, 1982). Plusieurs études ont montré que le pH a une forte influence sur cette mobilité et sur les quantités d'ETM extractibles (Hue et Ranjith, 1994 ; Richards *et al.*, 2000 ; Singh et Agrawal, 2008).

2.2.2. LES COMPOSES TRACES ORGANIQUES

Les CTO dans les boues proviennent de différents domaines d'activité humaine: Agriculture (produits phytosanitaires : atrazine, diuron...), transports (MTBE : méthyle-tertio-butyle-éther...), médecine (médicaments : antibiotiques, hormones...) et industrie (polychlorobiphényles : PCB, Hydrocarbures aromatiques polycycliques : HAP...). Ces produits chimiques utilisés dans la société moderne quotidiennement sont régulièrement trouvés dans l'environnement où ils peuvent induire des effets néfastes sur les organismes aquatiques (Gomez *et al.*, 2011), sur les micro-organismes du sol (Mougin *et al.*, 2011) et se concentrer finalement le long de la chaîne trophique (Meador *et al.*, 1995 ; Tracey et Hansen, 1996). L'épandage de boues de STEP ou l'irrigation avec les eaux usées en agriculture présentent un risque d'accumulation des ces composés dans le sol et/ou de

contamination des eaux de surfaces et/ou souterraines (**Stumpe et al., 2007**). En raison de leurs propriétés physico-chimiques, les résidus médicamenteux ou leurs métabolites sont pour la plupart des perturbateurs endocriniens. À des concentrations très faibles de ~ 1 ng, beaucoup d'études ont confirmé des effets endocriniens de la classe des stéroïdes tels que la diminution de la fécondité, la perturbation de l'équilibre hormonal aboutissant à une « féminisation » ou même à l'hermaphrodisme des organismes aquatiques (**Kuster et al., 2005**). Les CTO se dégradent dans les sols à des vitesses variables et n'ont donc pas un flux cumulatif. Des études avec les HAP et les PCB, substances cancérigènes, ont montré que leurs transferts dans les plantes sont très faibles (**Jauzein, 1995 ; ORDIF, 2003**). La fixation forte des CTO par la matière organique des boues et celle des sols diminue leur biodisponibilité vis-à-vis des plantes et des êtres vivants (**ORDIF, 2003**).

2.2.3. LES MICRO-ORGANISMES

Les micro-organismes pathogènes, potentiellement présents dans les boues, incluent des virus, des bactéries, des parasites et des champignons. (**Romdhana, 2009**). La charge en agents pathogènes dans les boues dépend essentiellement de l'état sanitaire de la population urbaine et de la présence ou non d'abattoir ou toute industrie traitant les produits animaux (**Tercé, 2003 ; Kistemann et al., 2008**). Le risque d'infection par ces agents pathogènes est dépendant d'une part de leurs concentrations, leur dispersion, la capacité de ces agents intestinaux à survivre dans l'environnement, la qualité et la procédure du traitement, et d'autre part de la dose infectante, l'exposition et la susceptibilité de la population exposée (**AFSSA, 2008**). Ces espèces peuvent être acheminées par les boues lors d'un épandage de celles-ci et contaminer ainsi les eaux, les sols et les aliments. L'entrée dans une problématique de déchet implique alors de limiter les risques que peut faire courir un tel intrant dans le processus de production agricole.

2.3. REGLEMENTATION

Dans un contexte général d'augmentation des quantités de boues d'épuration liée aux politiques environnementales de protection des eaux, les textes se succèdent et se conjuguent depuis la première loi sur l'eau de 1964 qui n'a pas prévu la gestion de boues. A partir de celle de 02/01/1992 entraînant l'augmentation des tonnages produits, la question d'élimination, de recyclage ou de valorisation préoccupe les collectivités locales et prennent l'initiative d'encadrer les épandages soumis aux procédures d'autorisation ou de déclaration (décret du 29/03/1993) (**Baize, 2002 ; Tercé, 2003**). L'arrêté du 08/01/1998 fixe les prescriptions techniques auxquelles doivent satisfaire les opérations d'épandage sur sol agricole : conception et gestion des épandages, qualité des boues et précautions d'usage, modalités de surveillance. Seul, un nombre très limité de substances est suivi réglementairement. Cependant, d'autres substances peuvent être contenues dans les boues, et l'incertitude qualitative n'est en aucun cas réduite à zéro. Ainsi, il convient de s'intéresser aux autres contaminants possibles. Le projet de directive des épandages agricoles prévoit un durcissement des normes dans l'objectif d'une meilleure protection de l'environnement (**Tableau 2**) (**Dousset et al.1999, ORDIF, 2003**) en proposant des valeurs limites en ETM dans les boues beaucoup plus faibles que celles en vigueur.

Tableau 2 : Teneurs limites réglementaires en éléments-traces métalliques des sols et des boues d'épuration municipales dans l'Union Européenne et en France (en mg kg⁻¹ de MS) :

Eléments Traces Métalliques (mg kg ⁻¹ MS)	Réglementation française Arrêté 08/01/1998		Réglementation européenne Projet future Directive Européenne (version 24/05/2000)		
	Teneurs limites dans les sols	Teneurs limites dans les boues	2005	2015	2025
Cadmium	2	15 et 10 à partir 1/01/04	10	5	2
Chrome	150	1000	1000	800	600
Cuivre	100	1000	1000	800	600
Mercure	1	10	10	5	2
Nickel	50	200	300	200	100
Plomb	100	800	750	500	200
Zinc	300	3000	2500	2000	1500
Cu+Cr+Ni+Zn		4000	-	-	-

Le décret de 1997 et l'arrêté de 1998 soulignent uniquement la teneur totale mesurée sans donner aucune importance ni à la capacité de rétention du sol en ETM, ni à la forme chimique des métaux présents. Dans ce sens, la réglementation française ainsi que la directive européenne de 1986 considèrent le sol comme un réservoir. Cette situation permet de caractériser trois cas :

- sol dont les teneurs d'ETM sont très faibles (souvent sableux) donc peut recevoir beaucoup de boues ;
- sol naturellement riche en ETM mais en dessous des seuils. On peut épandre mais moins que le premier cas ;
- sol excédant le seuil : épandage interdit.

Au niveau européen, une révision est en cours de la directive de 1986 qui prendra en compte du pH (<6 ; entre 6 et 7 ; >7) mais qui va abaisser encore les limites des teneurs en ETM. Certains pays de l'UE prennent en considération les facteurs influençant sur la mobilité des ETM. Alors, on distingue deux classes des teneurs limites en Espagne selon le pH du sol (pH>7 et pH<7). La région Flamande (Belgique) et les Pays-Bas ont adopté une législation propre à un sol standard, ainsi, une équation permet de calculer la valeur seuil (**Annexe 1 et 2**) pour les sols non standards en tenant compte du taux d'argile et de la teneur en MO (**Baize et Tercé, 2002**). On voit en effet assez difficilement comment la part de l'épandage pourrait diminuer du fait de l'abandon progressif de la mise en décharge de déchets non ultimes depuis 2002 (loi du 13 juillet 1992) et du surenchérissement des coûts et des contraintes fortes associés à la filière d'incinération.

Bien que les références nationales disponibles depuis une trentaine d'années et les observations concluent à l'innocuité des boues épandues en milieu agricole, la filière reste fragilisée par le refus de nombreux exploitants et le blocage quasi systématique des riverains. La contrainte commerciale reste le facteur prépondérant de cette tension qui pèse sur l'épandage agricole. En effet, des coopératives agricoles de collecte, ainsi que des industries agro-alimentaires, se sont trouvées en situation d'interdire aux agriculteurs d'épandre des boues sur les parcelles dont les productions leur sont livrées.

Les collectivités locales se posent la question sur le devenir de leurs boues et hésitent à investir dans une filière dont elles ne sont pas certaines qu'elle soit pérenne. D'ores et déjà, il est important de développer l'alternative d'épandage en parcelles boisées permettant de recycler les éléments fertilisants tout en minimisant les risques environnementaux éventuels et de mieux tenir compte des préoccupations de la société et des riverains.

3. EPANDAGE SYLVICOLE : UNE ALTERNATIVE COMPLEMENTAIRE A L'EPANDAGE AGRICOLE

3.1. L'ECOSYSTEME FORESTIER

L'écosystème forestier est particulièrement complexe ; c'est autant de processus que de composantes. Comme tout écosystème, il ne peut subsister que si tous les éléments qui concourent aux différentes étapes sont présents et fonctionnels. La production et la pérennité de cet écosystème reposent sur un ensemble de processus complexes et interactifs illustrés dans la **Figure 4 (Ranger *et al.*, 1995 ; Laclau, 2001)**.

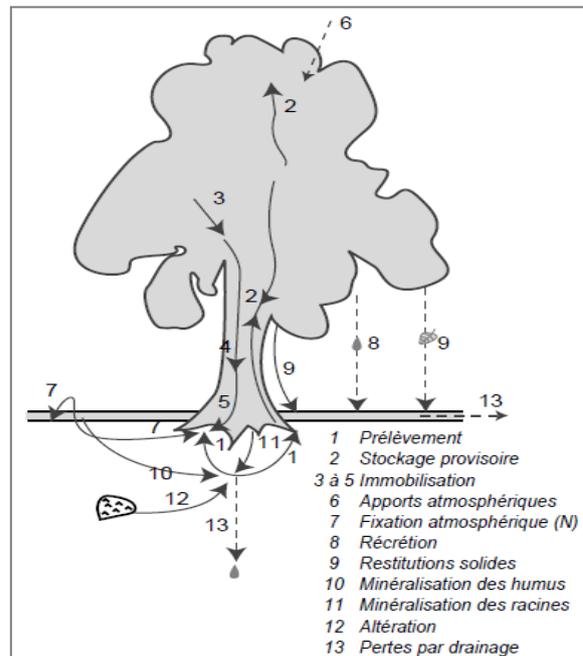


Figure 4 : Représentation schématique de la dynamique des éléments nutritifs en forêt (**D'après Ranger *et al.*, 1995**).

Le fonctionnement minéral de l'écosystème forestier est caractérisé par deux types de relations. D'une part, les relations sol-plante qui relatent les effets de la fertilité du sol sur la nutrition et par conséquent sur la production et d'autre part, les relations plante-sol qui concernent les effets de la végétation sur le fonctionnement du sol. Dans cette étude, je m'intéresserai plus particulièrement aux relations sol-plante compte tenu de l'effet fertilisant d'un apport de boues sur le sol.

La forêt française est très généralement installée sur des sols pauvres qui n'ont jamais intéressé l'agriculture ou qui ont été reboisés suite aux déprises agricoles successives, car de plus mauvaise fertilité (**Ranger *et al.*, 1995**). Les teneurs du sol en éléments nutritifs assimilables sont faibles et, bien que ces éléments soient facilement cédés par un complexe adsorbant peu développé, les arbres ont des difficultés à assurer leur nutrition minérale. Ces contraintes nutritionnelles sont accentuées d'autant plus quand il s'agit d'essences à forte production. Ainsi, le sol des stations forestières (écosystème forestier, plantation d'arbres) présente des besoins en fertilisants et leur faible fertilité constitue un frein à la croissance des arbres naturels ou plantés. Néanmoins, il est possible d'améliorer la fertilité du sol et

d'augmenter la production de matière ligneuse grâce à l'épandage de boues de STEP permettant un apport de matières organiques riches en éléments nutritifs. Cet enrichissement favorise la restructuration du sol, la régénération de l'activité biologique et la production de biomasse (**Benbrahim et al., 2003**).

L'alternative sylvicole aux épandages agricoles des boues de stations d'épuration a été bien explorée dans certaines situations forestières. Elle est interdite actuellement en France sauf à titre expérimental et après autorisation préfectorale (article 16 du décret du 8 décembre 1997). Malgré un manque de connaissances sur une telle pratique, des chercheurs soulignent ses avantages, ainsi, les produits forestiers ne sont généralement pas comestibles, ce qui diminue les risques de l'exposition humaine aux composantes néfastes des boues qui pourraient entrer dans la chaîne alimentaire. De plus, l'utilisation intensive de la biomasse forestière par de courtes rotations peut conduire à une baisse de fertilité des sols. Le recours à l'épandage des boues en forêt constitue non seulement une solution d'élimination mais aussi une voie à leur valorisation comme fertilisant (**Roy et Couillard, 1997**) permettant de restructurer ces sols dégradés par la forte exploitation. Cependant, cette pratique peut induire des risques de contamination du milieu hydrique superficiel par ruissellement ou du milieu hydrique souterrain par lessivage. car le pouvoir de rétention du sol a ses limites et nécessite une gestion très rigoureuse. Il est à noter que 1 % de la superficie forestière française suffirait à épandre 50 % des boues à raison de 3t MS ha⁻¹an⁻¹ (**Thomas et al., 2004**). D'autres parts, ces épandages ne concerneraient que les parcelles exploitées intensivement pour la production de bois de biomasse.

3.2. LE RESEAU ERESFOR

La valorisation en milieu forestier a été étudiée en France depuis les années 1970 mais restait extrêmement limitée si on la compare la littérature scientifique étrangère en la matière. Ces travaux concernent les essais mis en place en 1975-1976 par l'INRA Nancy (**Le Tacon et al., 1988**), les essais en contexte méditerranéen dans les années 1980 mis en place par la SCP (**Cadillon, 1995**), des essais plus récents (1992) mis en œuvre par l'ONF en forêt de Chantilly (**Le Gougec, 1997**) et les épandages de sous-produits papetiers dans l'Est de la France (**Bailly et al., 2004**). À partir de 1999, une coordination de plusieurs organismes (AFOCEL, INRA, CEMAGREF, IDF, ONF, Universités...) a mis en place une série d'essais, sur 24 sites sur toute la France sauf l'EST (**Figure 5**), visant à mieux évaluer les effets sur la biomasse forestière et sur le milieu environnant : C'est le réseau ERESFOR « épandage de produits résiduels sur parcelles boisées » (**Carnus, 2006**).

A partir de juin 2006, 6 sites en Franche-Comté viennent pour compléter la diversité des sols et des milieux, les doses testées, les peuplements et le nombre de paramètres suivis. Ce qui permettrait une analyse plus objective des résultats et les effets pourraient être interprétés sur une plus grande échelle. Les tendances générales de ces travaux étant :

- Amélioration de la croissance des plants;
- Diminution du taux de survie liée à l'augmentation de la végétation adventice (**Cadillon, 1995**);
- Modifications de l'écosystème (sol, biodiversité...);

- Réactions différentes des essences forestières. Ainsi, Les peuplements de résineux semblent mieux répondre à la fertilisation que les peuplements de feuillus, et ce d'autant qu'ils sont plus âgés (**Henry et Cole, 1986 ; Bailly et al., 2004**).

Dans le cadre de la problématique des incendies de forêt méditerranéenne, Les boues ont été épandues pour protéger ce milieu souvent dénaturé par les incendies. Une fertilisation, obligatoire face aux exigences zootechniques et agronomiques du maintien des troupeaux sur cet espace agro-forestier, par épandage de boues permet leur valorisation et l'entretien et la protection de l'environnement en créant de véritables pâturages (**Bascoul, 2000**). Ces données expérimentaux ont montré que les boues de stations d'épurations peuvent être utilisées comme amendements ou fertilisants pour augmenter la production végétale. Mais, il est nécessaire de poursuivre les investigations en termes de recherche et d'observation sur le long terme qui permettra d'établir des références techniques et des guides de bonne conduite validés par des expérimentations sur le terrain.

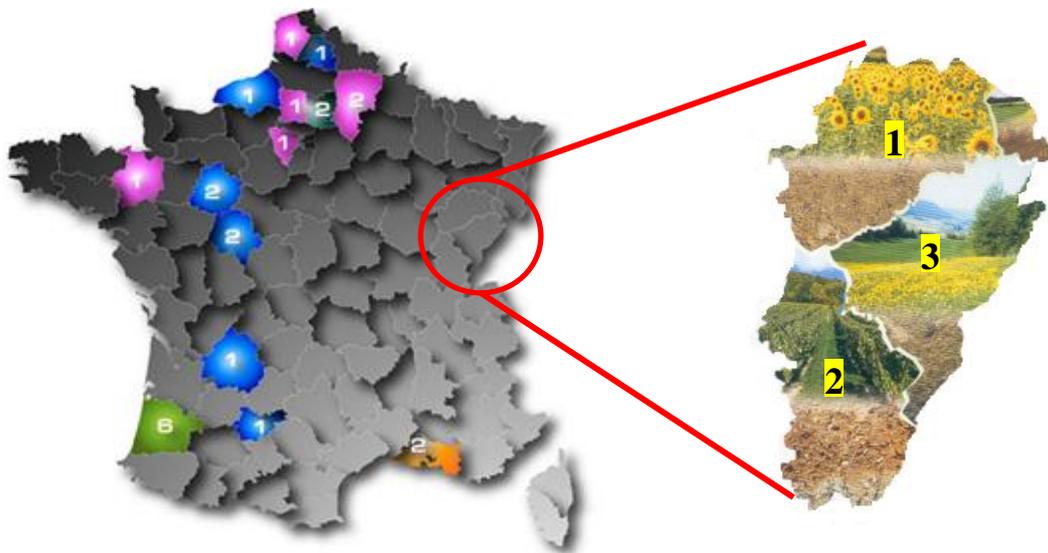


Figure 5 : Localisation des sites gérés par le réseau ERESFOR (d'après Carnus, 2006-modifiée).

3.3. CONCLUSION

La valorisation sylvicole des boues de STEP présente un risque moins élevé de contamination de la chaîne alimentaire humaine que leur utilisation en agriculture. Cette solution paraît intéressante mais encore faut-il en connaître les conséquences sur le milieu forestier ? Techniquement, cette pratique est applicable aux plantations forestières destinées à la production de biomasse ligneuse : les taillis à courte ou à très courte rotation (TCR et TtCR). Il conviendra à cet égard de mener une approche d'évaluation de la balance bénéfices et risques sur cet agro-écosystème dans l'objectif de préserver l'équilibre de cet environnement.

4. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE

Dans le but d'évaluer la balance « bénéfiques et risques » lié à l'épandage des boues en plantations boisées, trois principaux objectifs ont été définis :

1- L'évaluation du transfert des EM et ETM à la solution du sol et/ou à la nappe

Les sols forestiers présentent des caractéristiques quelques peu différentes de celles des sols agricoles. Hormis leur relative pauvreté en éléments minéraux, il s'agit assez souvent de sols acides et c'est le cas de la station de Mélisey (pH 4,7). De ce fait, ils retiennent assez mal les cations. Il s'agit donc de déterminer le devenir des ETM et EM amenés en quantité certes faibles mais non négligeables par les boues. Sont-ils immobilisés dans la litière ? Gagnent-ils des horizons plus profonds ? Dans quelles proportions ? Enfin, sont-ils susceptibles de contaminer la nappe phréatique à partir d'infiltrations en profondeur de la solution du sol ? Les réponses à ces questions, rapportées dans les chapitres I et II, permettraient de mieux déterminer le risque de contamination des ressources hydriques consécutivement à un épandage de boues.

2- La caractérisation des effets d'un apport de boues liquides de STEP sur la nutrition minérale et la croissance des arbres ainsi que sur la flore du sous-bois

Il s'agit ici de déterminer si l'apport d'éléments nutritifs lors de l'épandage d'une boue se traduit pour les arbres par une meilleure croissance - et donc par un gain de productivité de la parcelle - et, si c'est le cas, dans quelles proportions ? Le but est également d'examiner la productivité de la strate sous jacente. La croissance de ces végétaux est également stimulée par l'amendement et la mesure du gain de productivité de cet étage permettra d'estimer l'ampleur du phénomène de compétition entre les arbres et les espèces de sous-bois. Enfin, le suivi de l'évolution de la composition en espèces de la flore des étages inférieurs permettrait de mettre en évidence une éventuelle perturbation de l'équilibre de l'écosystème accompagnée d'une perte ou d'un gain de la biodiversité. Cette étude fait l'objet du chapitre III. Ce chapitre aborde également la proportion des ETM phytodisponible en déterminant les quantités absorbées et bioaccumulées.

3- L'étude des transferts des contaminants au sein des réseaux trophiques

Certains ETM sont connus pour être absorbés par les plantes et également en quantité importante par les champignons. Une contamination de l'écosystème par les réseaux trophiques doit donc être envisagée. Les escargots *Cantareus aspersus* (*Helix aspersa*) sont connus pour leur grande capacité d'accumulation des ETM dans leurs tissus quand ils sont exposés aux sols contaminés. En effet, leur utilisation comme organismes « bio-indicateur » est très pertinent en écotoxicologie terrestre car ils occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère et intègrent des sources (sol, détritux, végétation) et voies (digestive et dermique) de contamination multiples. Les concentrations des ETM seront déterminées dans chaque compartiment du continuum sol-plante-escargot, ce qui permettra d'apporter un élément de réponse concernant les transferts de ces métaux le long des réseaux trophiques et le risque de leur bioaccumulation.

Pour atteindre ces objectifs, les paramètres étudiés sont détaillés schématiquement dans la **Figure 6**.

1. Croissance et production de biomasse
2. Taux de minéralisation dans le sol
3. Allocation azotée ? Stock d’N - Nutrition minérale
4. Biodiversité du sous-bois
- **Bénéfices attendus**
5. Transfert des ETM vers la plante
6. Transfert des ETM vers la chaîne trophique (sol-plante-escargot)
7. Biodisponibilité des ETM dans la solution du sol
8. Lessivage des EM et ETM et contamination de la nappe
- **Risques éventuels**

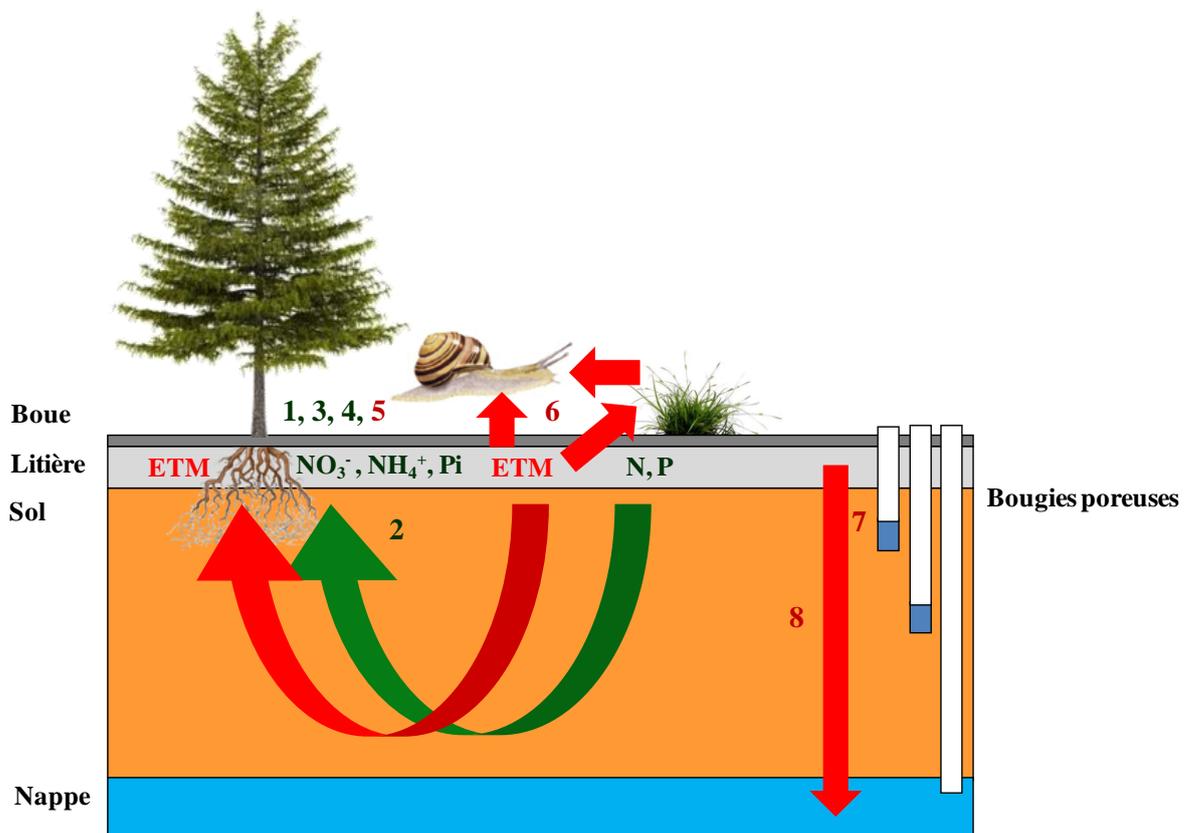


Figure 6 : Schéma illustratif des paramètres étudiés lors de ce travail de thèse.

Dans le cadre de cette thèse, il a été choisi d’avoir deux parties expérimentales menées en parallèle : la première est une approche terrain et la deuxième en conditions contrôlées au laboratoire. L’ensemble des résultats obtenus devrait permettre d’obtenir des informations assez complètes sur les effets de l’application de boues sur la station et plus précisément sur le mélèze et de mieux appréhender le rapport bénéfice/risque.

MATERIELS

&

METHODES

Ces travaux de thèse sont réalisés en grande partie sous conditions contrôlées complétées d'expérimentation en conditions naturelle sur le site de Mélisey (70).

1. DESCRIPTION DU SITE

1.1. INTRODUCTION - CONTEXTE

Devant le nombre restreint des études menées pour évaluer l'impact des boues de STEP sur l'écosystème forestier en France, l'INRA, le CEMAGREF, l'AFOCEL, l'IDF, l'ONF et l'ADEME ont établi un réseau national (ERESFOR) de sites d'épandage expérimentaux en 1999. Un groupe de travail assure le suivi régulier de ces sites afin d'apporter un grand nombre d'informations concernant les avantages et les risques liés à l'utilisation des boues en parcelles boisées.

En 2005, ce réseau regroupait 24 sites répartis sur tout le territoire français à l'exception de l'Est. Mais à partir de 2006, cinq sites expérimentaux ont été mise en place en Franche-Comté (**Tableau 3**) afin d'élargir la gamme de sols, de climats et d'essences forestières. Le suivi concerne le peuplement forestier (paramètres dendrométriques et prélèvement des aiguilles), le sous-bois (biodiversité, prélèvement de la biomasse, prélèvement de la strate fongique). En juin 2008, le site de Mélisey en Haute-Saône vient compléter ce dispositif. Ces sites ont été structurés selon deux niveaux :

- **niveau 1** : sites expérimentaux de base pour lesquels des protocoles allégés sont proposés, ainsi, le suivi porte sur le produit épandu, les caractéristiques physicochimiques des sols, la croissance et la nutrition des arbres, la composition floristique du sous-bois et la teneur en ETM dans les champignons. Ces sites, représentatifs de contexte régionaux, ont une triple vocation de site de démonstration, de référence régionale, et de valorisation nationale dans le cadre du réseau.
- **niveau 2** : sites ateliers orientés vers des activités de recherche et se caractérisent par un suivi plus intensif des différents compartiments de l'écosystème. L'accent est mis sur l'étude plus spécifique du compartiment « eau » avec une détermination de la composition chimique de la solution du sol et de l'eau de la nappe. Ces sites sont forcément limités compte tenu des coûts et ont vocation à être valorisés au plan scientifique.

Tableau 3 : Les différents sites d'épandage en Franche-Comté :

Département	Sites	Date des épandages
Doubs (25)	Arc-et-Senans	16-juin-06
	Mercey-le-Grand	21-juin-06
	Villers-sous-Chalamont	19-avr-07
Jura (39)	Parcey	30-juin-06
	St Lupicin	13-juin-07
Haute Saône (70)	Mélisey	02-juin-08

1.2. LOCALISATION DU SITE

Mélisey est une commune, située dans la région de Franche-Comté, département de la Haute-Saône (Longitude: 6,580 ; latitude: 47,753) à 328 mètres d'altitude. La commune s'étend sur 20,7 km² et compte 1 763 habitants en 2007. Le principal cours d'eau est

« l'ognon ». Mélisey est une commune du parc naturel régional des Ballons des Vosges. Le site expérimental est situé dans la parcelle 23 du lieu dit « Le bois Collin » sur la commune (Figures 7 et 8). Il s'agit d'une plantation de mélèzes (*Larix decidua*) d'une surface d'environ un hectare. Les arbres ont été plantés en ligne après la tempête de 1999 avec un espacement moyen de 3,5 m entre les lignes. La pente de la parcelle, déterminée par un clinomètre optique portable, varie entre 5 et 12 %.

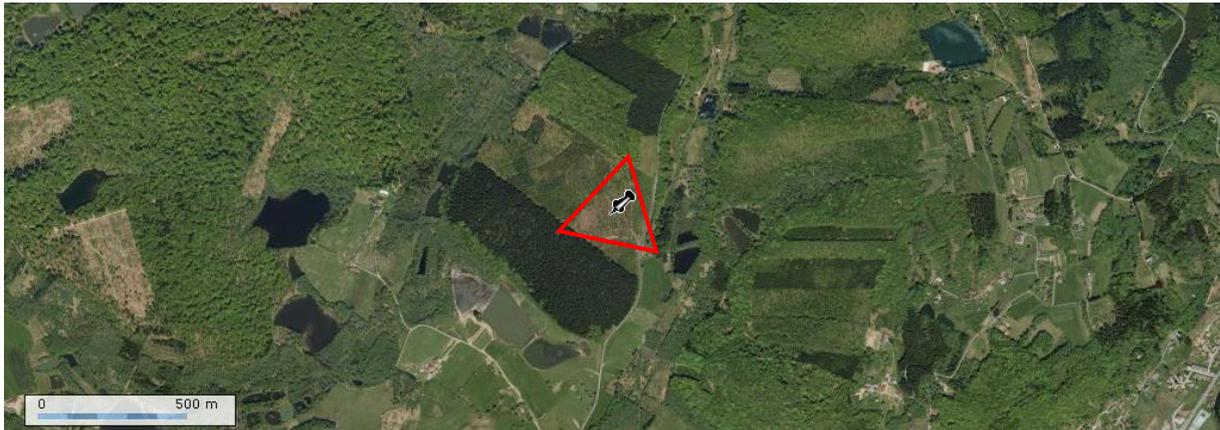


Figure 7 : Photo aérienne du site d'étude (triangle rouge) (Géoportail, 2012)

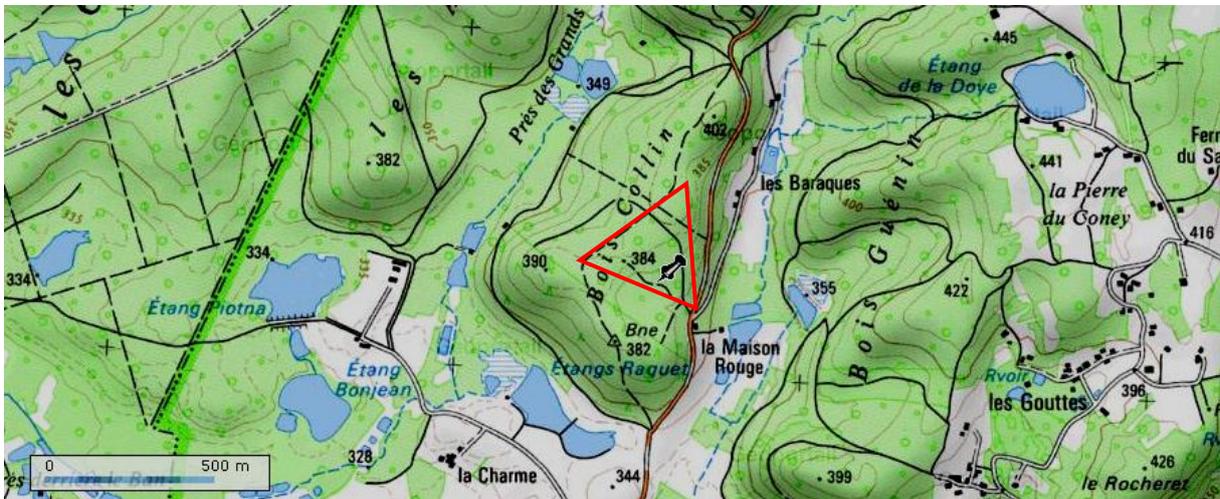


Figure 8 : Carte topographique de la zone d'étude (triangle rouge) (Géoportail, 2012).

Les mélèzes se distinguent des autres conifères par leurs aiguilles caduques. Le mélèze d'Europe (*Larix decidua*) a une aire naturelle étendue et très morcelée dans les massifs montagneux des Alpes, des Sudètes, du Centre de la Pologne et des Carpates. On le rencontre à l'étage montagnard et subalpin jusqu'à 2200m d'altitude, mais il colonise également les plateaux de Pologne et de Lublin entre 150 et 600m d'altitude (Hainry et Colombet, 2010). Il est souvent décrit comme une espèce pionnière héliophile (Rameau *et al.*, 1993). Elle supporte très bien les grands froids, les gelées et le vent. Les forêts de mélèzes constituent en même temps des peuplements de bois potentiellement de très haute qualité utilisé en charpenterie et en menuiserie.

1.3. CARACTERISATION DU SOL

Le fond géologique correspond à un dépôt glaciaire discontinu sur grès (**Figure 9**). Le sol est un pseudo-luvisol limono-sablo-argileux à dysmull. Il s'agit d'un sol à hydromorphie très modérée, dé-saturé, à faible activité macro-biologique.

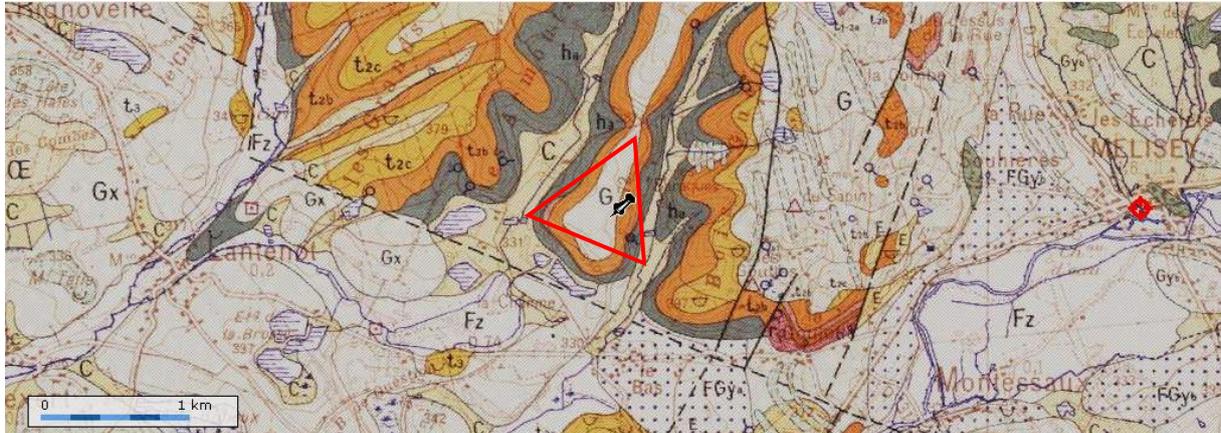


Figure 9 : Carte géologique de la zone d'étude (triangle rouge) (Géoportail, 2012).

Le profil pédologique de la parcelle varie considérablement selon la profondeur du sol. Ceci a nécessité de réaliser une cartographie générale de la parcelle (**Figure 10**).

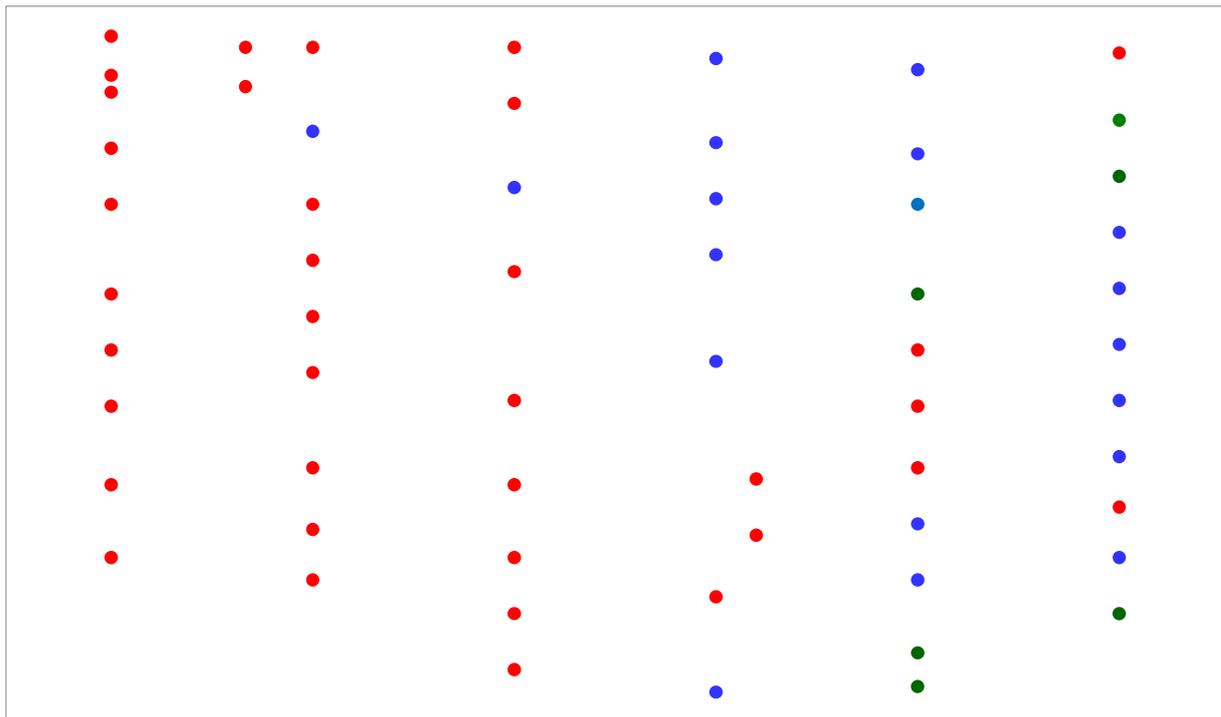


Figure 10 : Cartographie de la profondeur du sol (● : 0-40 cm, ● : 45-75 cm et ● : >80 cm).

Ainsi, on distingue principalement trois profils qui figurent en-dessous (**Figure 11**). Les **Tableaux 4a et 4b** donnent les caractéristiques physico-chimiques de l'horizon organique (A1).

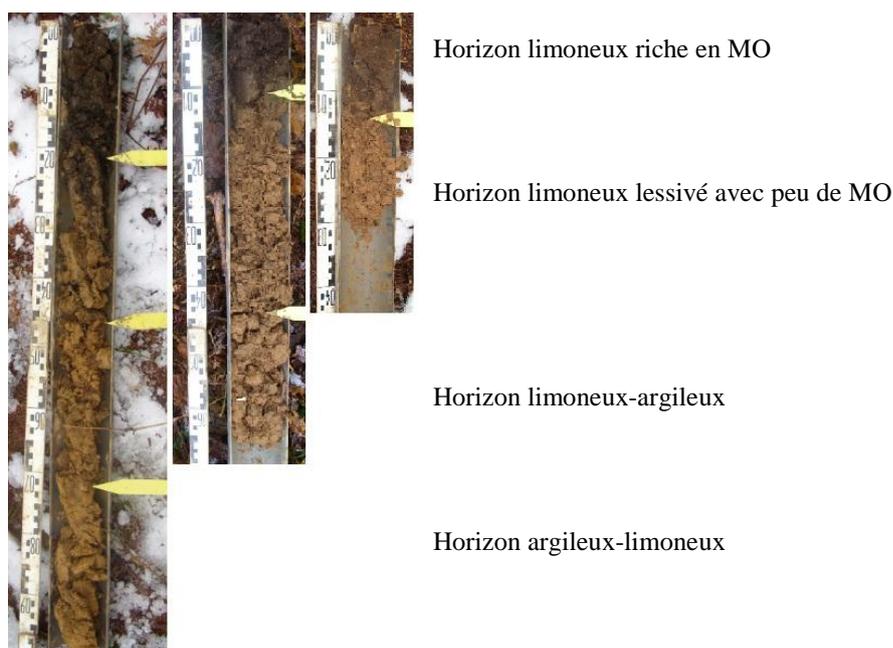


Figure 11 : Photographies des différents profils du sol.

Tableau 4a: Les caractéristiques physico-chimiques de l'horizon de surface:

Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	Densité apparente (g cm ⁻³)	pH (eau)	N tot (%)	C tot (%)	P tot (mg g ⁻¹ MS)	K (mg g ⁻¹ MS)	MO tot (%)	C/N
18,6	38	36,9	1,2	4,7	0,1	2,1	0,2	1,6	6,4	20,4

Tableau 4b: Les teneurs en éléments minéraux et en éléments traces métalliques de l'horizon de surface:

Cd (µg g ⁻¹ MS)	Cu (µg g ⁻¹ MS)	Pb (µg g ⁻¹ MS)	Zn (µg g ⁻¹ MS)	Ca (mg g ⁻¹ MS)	Mg (mg g ⁻¹ MS)	Na (mg g ⁻¹ MS)	Fe (mg g ⁻¹ MS)	Mn (mg g ⁻¹ MS)
0,2	7,1	13,0	61,0	0,5	2,7	0,1	10,9	0,2

1.4. CARACTERISATION DES BOUES EPANDUES

Les boues épandues sur le site de Mélisey sont issues de la station d'épuration du Syndicat mixte de Mélisey-Saint Barthélémy. Il s'agit de boues liquides « stabilisées aérobies » conformes pour un épandage en milieu agricole. Les caractéristiques physico-chimiques ainsi que les teneurs en éléments minéraux et en éléments traces métalliques de ces boues sont indiquées dans les **Tableaux 5a et 5b**.

Tableau 5a: Les caractéristiques physico-chimiques des boues épandues :

pH	N total (%)	C total (%)	C/N	P total (mg g ⁻¹ MS)	K (mg g ⁻¹ MS)	MO total (%)	MS (g L ⁻¹)
5,7	7,2	41,6	5,8	15,5	5,4	83,5	5,3

Tableau 5b: Les teneurs en éléments minéraux et en éléments traces métalliques des boues épandues :

Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Al	Ni	Co	Cr	Cu	Zn	Pb	Cd
(mg g ⁻¹ MS)						(µg g ⁻¹ MS)						
12,3	3,7	1,4	5,2	0,2	5,7	12,9	1,9	14,9	843,8	592,8	15,9	1,8

1.5. LE DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le dispositif expérimental correspond à 3 répétitions de deux modalités : T : témoin sans boues «T1, T2 et T3» et B : boues : «B1, B2 et B3 ». La surface de chaque placette est d'environ 1500 m². Un apport unique de Boues liquides a été effectué en juin 2008. L'engin a traversé également les placettes T pour éviter les biais liés à d'éventuels effets de tassement. La dose effective moyenne appliquée aux placettes B est de 27,8 m³ par hectare. Ainsi, la quantité de MS apportée par cet épandage (0,4 t MS ha⁻¹) est extrêmement faible comparée à la norme autorisée. Par conséquent, on a délimité des sous-placettes (SP) carrées de 2,5 m de côté « T'3, T'4, T'5 » et « B'3, B'4, B'5 » respectivement dans T et B. Ensuite, deux apports supplémentaires de 3 t MS ha⁻¹ de boues ont été effectués le 31 juillet 2009 et le 02 mars 2010.

Une nappe temporaire s'installe au nord-ouest du site à 80 cm de profondeur. Ainsi, quatre autres SP ont été délimitées (T'1 et T'2 ; B'1 et B'2) afin de détecter des éventuelles contaminations des eaux souterraines. La **Figure 12** schématise une description détaillée du site d'étude :

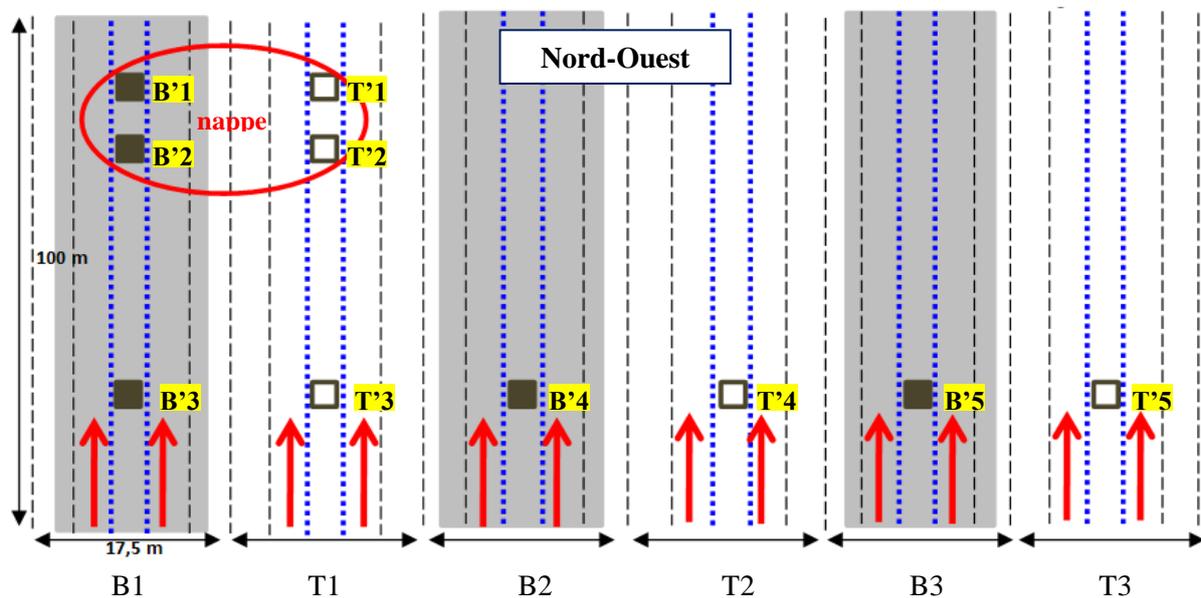
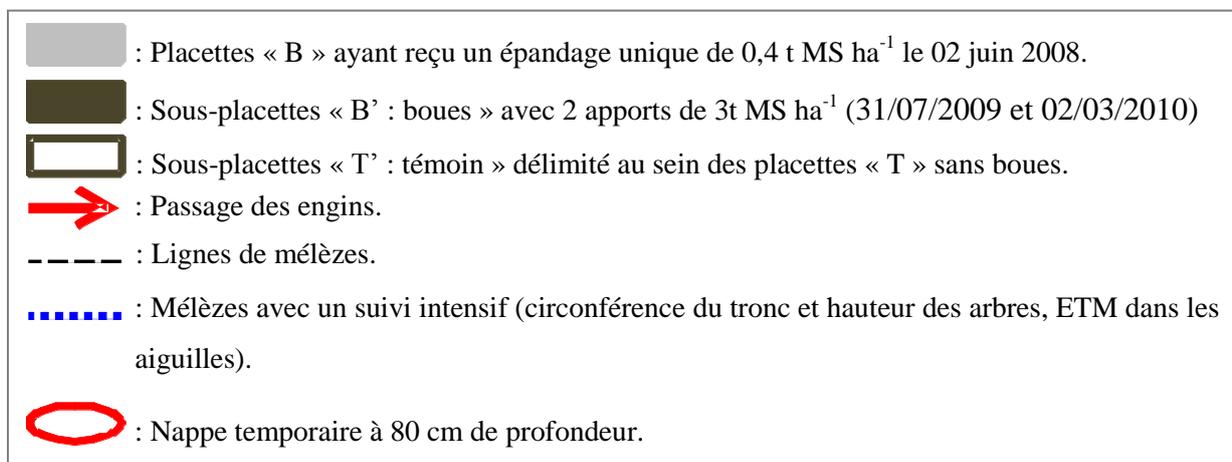


Figure 12 : Schéma du dispositif expérimental comprenant 3 répétitions de témoins (T) et de boues (B).

Légende :



1.6. RECOLTE DES ECHANTILLONS

1.6.1. LE SOL

Les campagnes mensuelles d'échantillonnage du sol se sont déroulées de mars 2010 à septembre 2010. Le prélèvement du mois de mars a été effectué juste avant le deuxième apport de boues dans les SP « B' » et « T' ». La litière (L : 0-2 cm) et l'horizon minéral sous-jacent (S : 2-10 cm) ont été prélevés à l'aide d'une truelle. Les échantillons ont été conditionnés en sac plastique puis conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

1.6.2. LA SOLUTION DU SOL ET L'EAU DE LA NAPPE

Pour prélever les solutions interstitielles du sol, des bougies poreuses ont été installées à 20 et à 40 cm avec trois répétitions dans chaque SP (**Figure 13**). La mise en dépression du système de 0,7 bar pendant 24h est effectuée avant de procéder au prélèvement de la solution du sol. Le prélèvement de l'eau de la nappe a été effectué à l'aide de trois piézomètres installés à 80 cm de profondeur dans les SP localisées à l'ouest du site. Les eaux récupérées dans chaque profondeur dans les trois sous-réplicats sont mélangées à part égale pour constituer l'échantillon à analyser. Un échantillon d'eau est prélevé également au niveau d'une source à proximité de la parcelle située en bas de pente à 50 m.



Figure 13 : a) Disposition des bougies poreuses dans une sous placette « B' » délimité par le carré rouge, b) Prélèvement de la solution du sol.

Nous avons réalisé un échantillonnage mensuel pour la solution du sol d'Avril à août 2010 et pour l'eau de la nappe de mars à août 2010. Chaque échantillon est scindé en deux : un placé directement au congélateur pour doser l'azote minéral (nitrate, nitrite et ammonium) et l'autre acidifié avec 5% de HNO₃ (pour éviter l'adsorption des métaux sur les parois des flacons) destiné aux dosages des EM et ETM par SAA ou ICP-AES.

1.6.3. LES AIGUILLES ET LES CHAMPIGNONS

Une analyse des aiguilles a été réalisée afin d'évaluer le transfert sol-plante des ETM et des EM. Les prélèvements des aiguilles ont été effectués en juin 2010 sur les quatre arbres qui entourent chaque SP. Les champignons ont été récoltés en octobre 2010 dans les placettes T et B. Les échantillons ont été conservés au frais dans une glacière jusqu'au laboratoire où ils ont été stockés à -80 °C.

1.7. LA CROISSANCE RADIALE ET LA HAUTEUR DES ARBRES

La croissance radiale a été suivie sur les plants de mélèzes des deux lignes centrales de chaque placette (Tirets bleus sur le schéma du site - **Figure 12**). Les arbres concernés ont été numérotés et les circonférences sont mesurées en octobre 2009 et octobre 2010 à l'aide d'un ruban souple exactement à 1,30 m au-dessus du sol.

Pour caractériser la croissance de ces arbres de manière plus précise, on calcul la surface terrière des individus du peuplement à l'aide de la formule :

$$C130^2/4\pi$$

C130 : circonférence mesurée à 1,30 m du sol

La surface terrière est la surface du sol que représente la section du tronc de l'arbre à 1,30 m de hauteur. Cette valeur, indicatrice de la croissance de chaque individu, est ensuite rapportée à une surface pour caractériser la croissance du peuplement.

1.8. LE SOUS-BOIS

La diversité des espèces du sous-bois apportera une indication sur l'impact possible des épandages de boues de STEP sur la biodiversité. Le fait d'apporter des boues dont la qualité chimique et organique est différente de celle du milieu récepteur va entraîner des modifications d'ordre édaphique pouvant influencer la flore présente sur le site amendé. Ainsi, il est nécessaire d'appréhender en détail cette composition floristique. En effet, des inventaires floristiques ont été réalisés en été 2008, 2009 et 2010 dans les placettes T et B. L'intégralité de la flore inventoriée concerne les espèces arbustives et herbacées. Pour chaque placette, on a noté :

- La hauteur moyenne de la strate herbacée ;
 - Le recouvrement moyen exprimé en % de la surface du sol ;
 - La liste des espèces et leur coefficient d'abondance-dominance :
- ⇒ 6 classes d'abondance-dominance sont définies :
- 0 : Espèce rare ou ne dépassant pas 10 individus dans la placette ;
 - 1: espèce représentant un recouvrement de 1 à 5 % de la strate herbacée ;
 - 2: espèce représentant un recouvrement de 5 à 25 % de la strate herbacée ;
 - 3: espèce représentant un recouvrement de 25 à 50% de la strate herbacée ;
 - 4: espèce représentant un recouvrement de 50 à 75 % de la strate herbacée ;
 - 5: espèce représentant un recouvrement supérieur à 75 % de la strate herbacée.

Dans chaque placette B et T, on a récolté aussi la totalité de la masse végétale dans 3 carrés de 50x50 cm pour quantifier la biomasse produite. Les carrés seront choisis au début, milieu et la fin de chaque placette. Les plantes sont coupées au ras du sol, mises dans des sachets en papier, puis séchées à l'étuve.

L'indice de similitude de Sorensen qui permet de comparer le paysage floristique entre deux parcelles, est calculé par le rapport entre le nombre d'espèces communes et la somme des espèces spécifiques à chaque parcelle. Exprimé en pourcentage, il permet d'évaluer les changements dans le paysage floristique à long terme. Les résultats de cette partie seront complétés par ceux obtenus par **Benbrahim (Rittmo)**.

En 2010, un relevé complémentaire a été effectué dans les SP découpées en mailles carrées par des ficelles d'un côté à l'autre tous les 25 cm (**Figure 14**). Cette méthode facilite le dénombrement des taxons et l'évaluation de leur abondance. Ces données ont été utilisées pour le calcul des indices de biodiversité : l'abondance relative de chaque espèce (AR%) et la richesse spécifique (S) correspondant au dénombrement d'espèces différentes.



Figure 14 : Dispositif utilisé pour l'évaluation des indices de biodiversité du sous-bois.

2. ETUDE AU LABORATOIRE

2.1. CULTURE DES PLANTS

2.1.1. LE MATERIEL VEGETAL

Afin d'assurer une cohérence avec les expérimentations *in situ* lancées sur le site de Mélisey, les travaux menés en conditions contrôlées au laboratoire ont été réalisés avec de jeunes plants de mélèze. Ces derniers, âgés de 1 an, ont été reçus dans un support de culture sous forme de godets (**Figure 15**).



Figure 15 : Les plants de mélèze en godet.

2.1.2. LE SUBSTRAT

Le substrat de culture provient de la parcelle de la commune de Mélisey. Il s'agit d'un sol forestier acide et pauvre prélevé dans l'horizon 0-40 cm en automne. Ce sol a été séché à l'air libre puis tamisé à l'aide d'un tamis à maille carrée d'1 cm². Après homogénéisation, il est réparti dans des pots de 3,6 ; 7,5 et 14 L avec respectivement 3 ; 6,7 et 12 kg de terre. Sa nature et sa composition sont détaillées dans les **Tableaux 4a et 4b**.

2.1.3. LES CONDITIONS DE CULTURE

Les jeunes plants ont été placés dans une chambre de culture avec une photopériode fixée à 14 heures de jour et 10 h de nuit. La température moyenne est de 24 °C en journée et 14 °C pendant la nuit, le niveau d'éclairement est de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et l'hygrométrie de 60 %. L'humidité du substrat est maintenue entre 60 et 70 % de sa capacité au champ, ainsi, les apports en eau, déminéralisée, ont été effectués régulièrement trois fois par semaine après la pesée de chaque pot.

2.1.4. MISE EN CULTURE

Les jeunes plants ont été acclimatés aux conditions de la chambre de culture pendant une semaine dans leurs godets. Avant la transplantation, les plants ont été séparés de leur motte et les racines ont été lavées délicatement avec de l'eau déminéralisée (**Figure 16a**). La longueur de la tige et de la racine ont été mesurées. A raison d'un seul plant par pot (**Figures 16b et 16c**), les plants sont repotés et arrosés immédiatement afin d'assurer une bonne reprise car la plantation à racines nues de résineux entraîne pour les plants un choc de transplantation qui est à l'origine de pertes importantes à la plantation (**Aussenac et El Nour, 1986**).

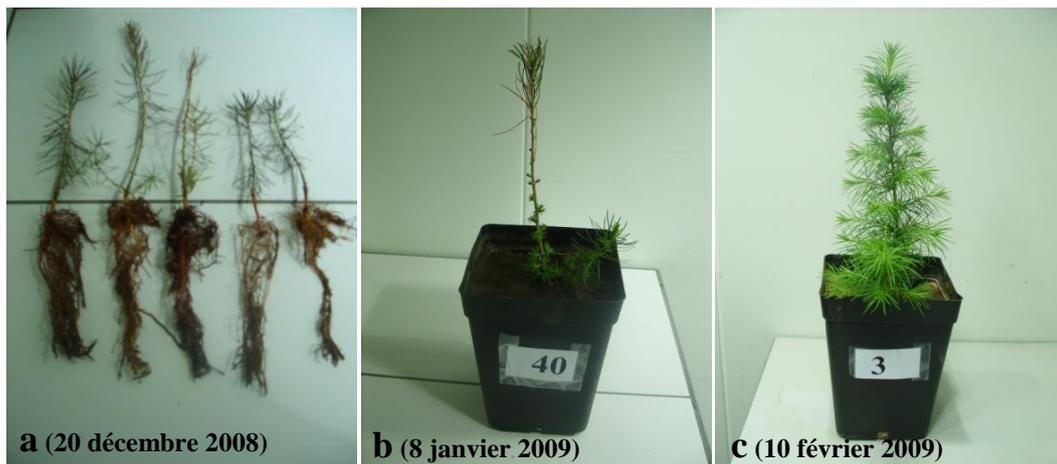


Figure 16 : Plants de mélèze : a) racines nues, b) débourrement des bourgeons, c) développement des rameaux secondaires.

2.2. LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La présente étude vise à évaluer l'impact à court et à moyen terme d'un apport de boues de station d'épuration sur les plants de mélèze en pot. Le traitement consiste alors à une application des boues à la surface des pots. Bien qu'il n'existe actuellement pas de législation régissant l'apport de boues en parcelle boisée, les épandages réalisés à titre expérimental - notamment sur le site de Mélisey - se fondent sur la législation des épandages en milieu agricole. La quantité d'épandage cumulée sur 10 ans autorisée dans un contexte agricole est de 30 tonnes de matière sèche par hectare (article 15 de l'arrêté du 8/01/1998). A partir de cette norme, deux traitements ont été définis. Le premier traitement (B1) consiste à apporter en une fois la quantité maximale de matière sèche autorisée sur 10 ans (soit l'équivalent de 30 t MS ha⁻¹) tandis que le double de cette quantité (soit l'équivalent de 60 t MS ha⁻¹) est apporté par le deuxième traitement (B2). En parallèle, le traitement témoin ne recevait aucun apport

de boues. Cinq répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. Un lot de 5 plants (R_0) servant de témoin initial a été échantillonné. Les organes des plants ont été récoltés séparément (aiguille, tige, racine), séchés puis broyés en poudre fine stockée jusqu'au dosage.

Les boues proviennent de la station d'épuration de la commune de Mélisey et leur composition est précisée dans les **Tableaux 5a et 5b**. Elles présentent une faible teneur en matières sèches ($5,3 \text{ g L}^{-1}$). Dans ces conditions, les traitements B1 et B2 nécessitent d'apporter un volume considérable aux pots. Afin de réduire ces volumes, on a augmenté la siccité par une simple décantation. Ainsi, les boues appliquées sont pâteuses ($22,9 \text{ g MS L}^{-1}$). L'eau éliminée est analysée et sa composition est équivalente à l'eau rejetée par la station d'épuration dans le milieu récepteur. Les volumes calculés des boues (**Tableau 6**) ont été apportés en trois fois après une bonne reprise des mélèzes. La croûte formée en surface par la boue est brisée pour éviter d'asphyxier le sol.

2.3. CALCUL DES DOSES DE BOUES

Le volume de boues à appliquer aux pots est calculé sur la base du contenu des pots en sol. Ainsi, sur une profondeur de 30 cm, le volume de terre de la parcelle de Mélisey est estimé à 3600 t ha^{-1} . Les volumes sont détaillés ci-dessous dans le **Tableau 6**.

Tableau 6: calculs des volumes de boues appliqués aux pots selon les modalités :

Volume du pot	3,6 L			7,5 L			14 L		
Quantité de sol par pot	3 kg			6,7 kg			12 kg		
Modalités	T	B1	B2	T	B1	B2	T	B1	B2
Quantité de boues en g de MS	0	24,5	48,9	0	55,8	112	0	100	200
Volume de boue en L	0	1,06	2,13	0	2,44	4,88	0	4,63	9,26

L'épandage de boues de station d'épuration fournis une part non négligeable d'azote (N) et de phosphore (P) aux cultures. Le **Tableau 7** montre les taux d'enrichissement du sol en N et en P ainsi que les équivalents apportés en kg ha^{-1} .

Tableau 7: Indications du % d'enrichissement du sol et de l'équivalent apporté en N et P :

Modalités	% d'enrichissement		L'équivalent apporté en Kg ha^{-1}	
	N total	P total	N	P
B1	42	64	2160	465
B2	84	128	4320	930

2.4. RECOLTES DES SEMIS ET CINETIQUES EXPERIMENTALES

Les récoltes ont été réalisées en fonction de la durée de culture après l'application de boues. Cinq dates ont été choisies au cours de cette expérience. La **Figure 17** présente schématiquement la cinétique expérimentale. Les plants de la récolte R_5 (18 mois) ont été placés à l'extérieur d'octobre 2009 à mi-mai 2010 afin qu'ils subissent la saison hivernale *in situ*.

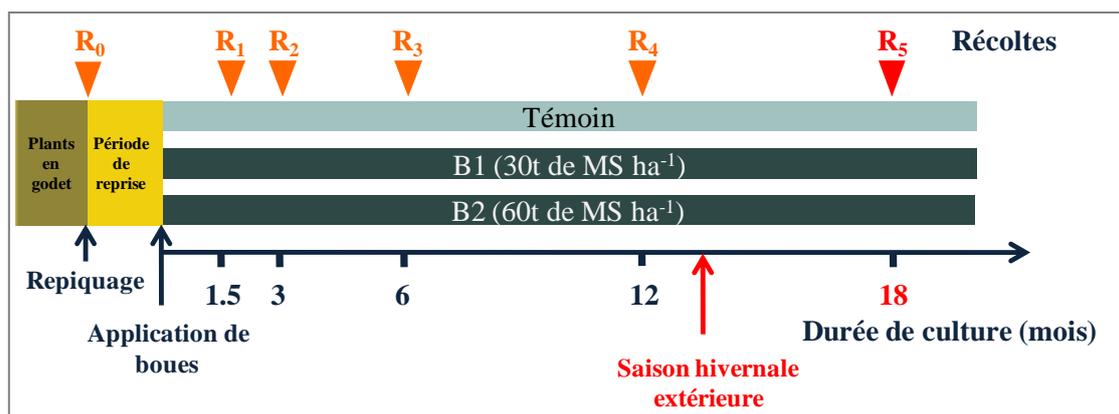


Figure 17 : Représentation schématique du plan expérimental.

2.5. L'ECHANTILLONNAGE

2.5.1. LE VEGETAL

Au moment de la récolte, la partie aérienne est séparée de la partie racinaire, lavée à l'eau déminéralisée après dépotage, au niveau du collet. La hauteur de la tige et la longueur maximale de la racine ont été mesurées à l'aide d'une règle graduée. Puis, les différents organes (racines latérales (RL), racine pivot (RP), tige principale (TP), ramifications (RAM), aiguilles anciennes (A_0) et aiguilles néoformées (A_1)) sont séparés et les masses fraîches sont déterminées.

100 mg MF de A_1 et de RL ont été prélevés juste après la récolte pour le dosage *in-vivo* de la nitrate réductase (NR), puis des fractions aliquotes de 200 mg ont été immédiatement congelées à l'azote liquide et stockés à $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pour le dosage de l'activité *in vitro* de la superoxyde dismutase. L'ensemble des échantillons ont été lyophilisés pendant 72 heures. Les valeurs de biomasses sèches ont été déterminées et ont permis de calculer le taux de croissance relative (*Relative Growth Rate*, RGR : en $\text{g g}^{-1} \text{ jour}^{-1}$). Le RGR a été calculé en sautant un prélèvement sur deux, plutôt que dérivés à partir des valeurs de prélèvements adjacents, afin de réduire la variation entre prélèvements (**Cheeseman et Wickens, 1986 ; Wickens et Cheeseman, 1988**). Le RGR est un indicateur de la croissance exponentielle de la plante : la biomasse créée au temps ($t+n$) étant mise en relation avec la biomasse existante au temps t .

$$\text{RGR (g g}^{-1} \text{ jour}^{-1}) = ((\text{Ln}(\text{MS})_{t+n} - \text{Ln}(\text{MS})_t) / (t+n) - t) \quad (\text{Singh et Agrawal, 2010})$$

Enfin, ces échantillons ont été réduits en poudre fine à l'aide d'un broyeur à bille (Retsch MM 200) ou à couteaux (MF 10 basic) puis stockés dans des flacons hermétiques.

2.5.2. LE SOL

Le sol est prélevé dans la couche supérieure 0-5 cm du pot ($H >$) et dans le fond du pot ($H <$) pour détecter un éventuel lessivage des éléments apportés par les boues. Le sol échantillonné et les résidus de boues récupérées à la surface du sol (R_b) sont conservées à $4\text{ }^\circ\text{C}$ et une aliquote de ces échantillons est séchée à l'étuve à $60\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 48h, tamisée à 2 mm puis broyée finement dans un broyeur à mortier (Retsch RM 100).

3. LES PARAMETRES D'ANALYSES

3.1. LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES

3.1.1. LE pH

Le pH joue un rôle crucial dans la mobilité des ions car il influence le nombre de charges négatives pouvant être mises en solution (**McLaughlin, et al., 2000**). D'une façon générale, lorsque le pH augmente, les cations sont moins solubles et les anions sont plus solubles (**Blanchard, 2000**). Le pH du sol est déterminé avec un WTW pH 300i Meter à partir d'une solution (2:5) (p/v) du sol et d'eau déminéralisée après 2 heures d'agitation à température ambiante (**Fuentes et al., 2007**).

3.1.2. LE POTENTIEL REDOX

Au moment de la récolte, une mesure du potentiel d'oxydoréduction (Eh) est effectuée à l'aide d'une électrode en métal inerte (la platine) raccordée au pH-mètre (WTW pH 300i Meter). Ce paramètre permet de déterminer le taux de réduction dans le sol et donc le déficit en oxygène. L'électrode est introduite dans le sol à 5 cm de profondeur. Eh varie inversement au pH (**Deneux-Mustin et al., 2003**) et constitue un très bon indicateur de la mobilité des éléments métalliques.

3.2. ANALYSE DE CROISSANCE ET MESURES ECOPHYSIOLOGIQUES

3.2.1. LA CROISSANCE ET LE POTENTIEL HYDRIQUE MINIMUM

La hauteur de la tige principale ainsi que la longueur totale des racines ($\pm 0,1$ cm) sont mesurées à chaque récolte. La partie aérienne est d'abord prélevée dans son intégralité et, immédiatement après section, le potentiel hydrique est déterminé par la méthode de la chambre à pression de Scholander. Ces mesures ont été réalisées, au minimum, après 3 h d'illumination. Il s'agit donc du potentiel hydrique minimum. Une cinétique de croissance de la tige a été réalisée sur les plants de la récolte R₄ (12 mois).

3.2.2. LA BIOMASSE SECHE

Les biomasses sèches de l'ensemble des échantillons ont été déterminées par pesée après lyophilisation.

3.2.3. L'ACCROISSEMENT DES CERNES

Une approche dendrologique permettra d'évaluer l'effet de la fertilisation par l'apport de boues de stations d'épuration sur l'accroissement annuel des plants de mélèze. Ainsi, les largeurs de cerne ont été mesurées au 1/100^{ème} de millimètre. Une coupe transversale est réalisée à 5 cm du collet sur les plants de 18 mois de culture. À l'aide d'un système d'imagerie informatique, la largeur des cernes est mesurée sur les quatre côtés de chaque coupe par deux expérimentateurs différents. Ensuite, l'écorce est isolée sur une longueur de 1 cm de la tige, ainsi que chaque cerne. Ces échantillons ont été lyophilisés et minéralisés pour le dosage des EM et ETM (voir § 3.3.4).

3.2.4. LES ECHANGES GAZEUX

Les mesures d'échanges gazeux, qui déterminent la photosynthèse nette exprimée par l'assimilation nette en CO₂, ont été effectuées grâce à un analyseur à gaz infrarouge de type LICOR 6400 (LI-COR-6400, LI-COR Biosciences, Inc., Lincoln USA) relié à une chambre à conifère « *conifer chamber* » (**Figure 18**). Quatre campagnes de mesures ont été réalisées de juin à septembre sur les mêmes rameaux portant des aiguilles saines et de même âge. Il s'agit des rameaux de la première année, effilés, portant des aiguilles isolées (récolte R₄ en 2009) ou bien de plusieurs rameaux courts, insérés sur le rameau de l'année 2009, portant des aiguilles en rosette (récolte R₅ en 2010). Deux rameaux par plant et trois plants par modalité ont été choisis. Pour placer le rameau dans la chambre, les aiguilles gênant sa fermeture des deux côtés sont prélevées et celles qui sont introduites sont dénombrées. Les aiguilles prélevées servent aux calculs de la surface foliaire et sont ensuite congelées pour déterminer la teneur en chlorophylle. Les mesures ont été effectuées dans les conditions ambiantes de la chambre de culture (25 °C, 60 % HR et 200 μmol m⁻² s⁻¹). Seul, le débit de CO₂ était fixé à 400 μmol s⁻¹. Quand l'assimilation et la conductance stomatique étaient stables, une dizaine de mesures étaient enregistrées à une minute d'intervalle.



Figure 18 : a) Chambre à conifère, b) Disposition du rameau dans la chambre durant la mesure.

3.3. ANALYSES CHIMIQUES

3.3.1. L'AZOTE KJELDAHL

Les teneurs en azote total sont déterminées par la méthode de Kjeldhal (**Mathieu et Pieltain, 2003**). 1 g de sol est mis en présence d'1 g de sel de sélénium et de 15 mL d'acide sulfurique à 96 %. L'ensemble est chauffé 3h à 360 °C. Les échantillons ont ensuite été passés au distillateur semi-automatique « Gerhardt », qui convertit par distillation en milieu basique les sels d'ammonium produits par la minéralisation, en vapeur d'ammoniaque. Après condensation celui-ci est recueilli dans l'acide borique puis titré par H₂SO₄ (N/25) en présence d'un indicateur coloré (vert de bromocrésol).

3.3.2. LE CARBONE ORGANIQUE, L'AZOTE TOTAL ET LE RAPPORT C/N

Les teneurs en N total-Kjeldahl sont légèrement plus faibles que celles de N total, obtenus par l'analyseur CNS (carbone/azote/soufre), en moyenne de 0,18 % (**Giroux et al., 2004**). Des creusets en céramiques contenant environ 300 mg d'échantillons, séchés et broyés finement, sont introduits dans un appareil de type LECO CNS 2000. A haute température

(1100 °C), la matière organique est totalement oxydée par combustion. Les gaz libérés sont alors analysés en spectrométrie à infrarouge ce qui permet d'en doser la teneur en carbone. La teneur en azote est mesurée grâce à une cellule à conductivité thermique.

3.3.3. L'AZOTE MINERAL

L'extraction a été effectuée dans les 48h qui suit le prélèvement avec des échantillons frais conservés à 4 °C afin de limiter les évolutions des teneurs en azote minérale (**Viaux, 1980**). Les sols sont incubés pendant 60 min au bain marie à 50 °C dans une solution KCl 2M avec un rapport 1:1,5 (p:v). Après 15min de centrifugation à 4000 RPM, le surnageant est filtré puis conservé à -20 °C jusqu'à analyse. Les nitrates, les nitrites et l'ammonium (NO_3^- , NO_2^- et NH_4^+) ont été dosés par colorimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre intégré à un analyseur automatisé de type Skalar. Les nitrates sont réduits en nitrites dans une colonne de cadmium. Les nitrites totaux réagissent avec le sulfanilamide pour former un composé diazoïque qui se combine en milieu acide avec le dihydrochlorure de N-(1-naphthyl)-éthylènediamine pour former un composé rosé à violet dont l'absorbance à 540 nm est proportionnelle à la concentration des ions nitrite totaux. Par soustraction de la concentration propre en nitrite de l'échantillon (sans passage par la colonne Cd), on détermine la concentration en nitrate. L'azote ammoniacal réagit en présence de salicylate, de nitroprussiate de sodium et de chlore actif pour former un complexe vert dont l'absorbance à 660 nm est proportionnelle à la concentration d'azote ammoniacal. Les solutions d'étalonnage ont été préparées à partir des solutions mères (1 g L^{-1}) de nitrate de potassium (KNO_3), nitrite de sodium (NaNO_2) et chlorure d'ammonium (NH_4Cl). La gamme des concentrations va de 2 à 10 mg L^{-1} .

3.3.4. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES ET LES ELEMENTS MINERAUX

Le dosage des ETM (Cu, Zn, Pb et Cd) et des EM (P, K, Mg, Ca, Mn, Fe et Na) a été réalisé selon la méthode de **McGrath et Cunliffe (1985)** et de **Garcia-Delgado et al. (2007)**(Norme ISO 11466 :1995 (F)). 1 g de sol, séché et broyé, est minéralisé dans 10 mL d'eau régale (HCl à 37 % et HNO_3 à 65 % (3:1) (v:v)) dans un bloc chauffant à 150 °C pendant 2 h. Les minéralisats sont ensuite ajustés à 80 mL avec de l'eau distillée acidifiée (HNO_3 à 5 %), centrifugés à 4000 RPM pendant 10min puis les surnageants recueillis sont conservés jusqu'à l'analyse.

Pour le matériel végétal, 100 mg d'échantillon sont mis en présence de 2 mL d'acide nitrique HNO_3 à 65 % puis placés au bloc chauffant pendant 3 heures à 125 °C. Les extraits obtenus sont ensuite repris dans 30 mL d'eau distillée acidifiée (HNO_3 à 5 %) puis filtrés à l'aide d'un embout filtrant ($0,45 \mu\text{m}$) et conservés jusqu'à analyse.

Une extraction avec une solution de chlorure de calcium permet d'évaluer efficacement, si la solution est centimolaire, la part biodisponible du cuivre dans le sol, facilement assimilable par les végétaux. Un échantillon de sol est mis en présence d'une solution saline 0,01 M de CaCl_2 avec un rapport égale à 1:10 (p:v). Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le mélange est centrifugé à 4000 RPM pendant 10 minutes puis le surnageant est conservé jusqu'à l'analyse. Cette efficacité repose surtout sur la faible modification du pH naturel du

sol lors de l'extraction et le déplacement aisé par Ca^{2+} des ions fixés sur le complexe argilo-humique du sol (**Houba et al., 1990 ; Lebourg et al., 1996**).

Seuls, le dosage du Pb et de Cd a été réalisé au spectrophotomètre d'absorption atomique (VARIAN 220Z) dans un four de graphite. Tandis que l'ensemble des analyses chimiques a été réalisé au laboratoire d'hydrologie et de géochimie de Strasbourg (CNRS-UMR7517) avec une ICP-AES (*Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*). L'eau distillée utilisée pour la préparation des minéralisats de chaque récolte provenait de la même distillation afin d'éviter les contaminations.

3.4. LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES

3.4.1. LA NITRATE REDUCTASE

L'objectif de ce dosage consiste à étudier l'impact du stock d'azote apporté lors d'un épandage de boues sur l'activité de la nitrate réductase (NR) responsable de la réduction des nitrates (NO_3^-) disponibles dans le sol en nitrite (NO_2^-) qui seront ultérieurement réduits en ions ammonium (NH_4^+). La mesure *in vivo* de l'activité NR, adaptée à partir des travaux de **Billard et Langlois (1986)**, consiste à doser les nitrites formés par la réduction des nitrates dans l'échantillon frais. Ainsi, ce dosage a été effectué au moment de chaque récolte.

100 mg d'aiguilles ou de racines sont coupées en petits fragments de 2 mm puis introduites dans des tubes à essais contenant 5 mL de milieu d'incubation (Tampon phosphate 100 mM (pH 7,5) avec ou sans KNO_3 (150 mM), Propanol-1 3 % (v/v)). Les tubes sont mis sous vide pendant 10 minutes afin de permettre l'infiltration des nitrates dans les tissus végétaux puis mis à incuber à 30 °C pendant 30 minutes à l'obscurité. L'arrêt de la réaction est obtenu par addition de 0,5 mL d'acide acétique (50 %). Les nitrites produits sont alors révélés dans 2 mL de la solution incubée en ajoutant dans l'ordre 1 mL de sulfanilamide (5 g L^{-1} dans 50% acide acétique) et 1 mL de dihydrochlorure de N-(1-naphthyl)-éthylènediamine (0,2 g L^{-1} dans 50 % acide acétique). Après 15 minutes de réaction à température ambiante et à l'obscurité, le composé azoïque rose violet qui se forme lors de la réaction est dosé par spectrophotométrie à 540 nm. L'activité de la NR est exprimée en μg de NO_2^- produit par g de MF et par heure.

3.4.2. LA SUPEROXYDE DISMUTATSE

Au cours du processus de développement, les plantes génèrent naturellement les espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries et les chloroplastes et par les oxydases membranaires. Cependant, une exposition aux ETM provoque un «stress oxydant» qui induit une augmentation de la production de ces ROS. Parmi les ROS, on distingue le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), son précurseur l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (HO^{\bullet}). Ces trois formes sont les plus étudiées dans le cas d'un stress oxydatif. $\text{O}_2^{\bullet-}$ est relativement instable et peut être dismuté en H_2O_2 spontanément à pH acide par des processus photo-oxydatifs ou enzymatiquement par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase (SOD) (**Fridovich 1986**). L'activité SOD a été évaluée par spectrophotométrie, une méthode proposée par **Beauchamp et Fridovich (1971)** et modifiée par **Oberley et Spitz (1985)**. Ce dosage *in vitro* a été effectué sur des échantillons conservés à -80 °C. Le système xanthine-xanthine oxydase génère un flux d'ions superoxyde

captés par le bleu de tétrazolium (NBT) qui se trouve alors réduit en bleu de formazan de couleur bleu-violet et qui absorbe à une longueur d'onde de 560 nm. En présence de SOD, ce flux d'électrons est intercepté et la réduction du NBT est inhibée.

100 mg d'aiguilles ou 200 mg de racines latérales sont broyées dans un mortier avec un peu de sable de Fontainebleau en présence d'azote liquide dans un mortier maintenu au froid jusqu'à obtention d'une poudre fine. On ajoute alors 25 % (p:p) de polyvinylpyrrolidone (PVPP) et 10 % (p:p) de polyéthylène glycol (PEG), puis 1,2 mL de milieu d'extraction. Le broyat est centrifugé pendant 20 minutes à 4 °C à 10000 g. Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique. La formation de bleu formazan en présence ou en absence de SOD est suivie spectrophotométriquement à 560 nm et à 25 °C. L'activité de la SOD est exprimée en U par mg de protéine. Cette unité U équivaut à la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une inhibition de 50 % de la réduction du NBT.

3.4.3. LA CHLOROPHYLLE

Pour le dosage des teneurs en chlorophylle, les aiguilles congelées à -80 °C ont été découpées en fragments de 2 mm et incubées pendant 5 h dans 5 mL à 100 % diméthylsulfamide (DMSO) (saturé en CaCO₃ pour éviter phéophtisation) à 60 °C jusqu'à ce que la solution devienne translucide (**Robakowski et al., 2004**). L'absorbance de l'extrait a été mesurée par spectrophotométrie aux longueurs d'onde 664,9 ; 648,2 et 750 nm. La Chlorophylle a, b et a+b ont été calculés selon les équations de **Barnes et al. (1992)**.

$$\text{Chlorophylle a (mg L}^{-1}\text{)} = 14,85 \times (A_{664,9} - A_{750}) - 5,14 \times (A_{648,2} - A_{750})$$

$$\text{Chlorophylle b (mg L}^{-1}\text{)} = 25,48 \times (A_{648,2} - A_{750}) - 7,36 \times (A_{664,9} - A_{750})$$

$$\text{Chlorophylle a+b (mg L}^{-1}\text{)} = 7,49 \times (A_{664,9} - A_{750}) + 20,34 \times (A_{648,2} - A_{750})$$

4. ECOTOXICITE DES EPANDAGES DE BOUES

Les sols amendés par des boues d'épuration ne constituent pas un réservoir statique de polluants. Ces derniers, susceptibles d'être mobilisés dans la phase aqueuse, peuvent être transférés en profondeur (lessivage) ou en surface (ruissellement) vers les retenues des eaux. Ainsi, l'impact d'une pollution peut s'apprécier à l'aide de « bio-indicateurs » qui se situent à différentes échelles de l'écosystème. Les essais en écotoxicologie aquatique sont sensibles, simples relativement rapides, peu coûteux, reproductible et ont une bonne pertinence écologique (**Keddy et al., 1995**). Bien que le nombre de tests validés et normalisés disponibles soit plus élevé dans le domaine aquatique, le risque lié à la matrice du sol ne peut être élucidé que par l'usage d'organismes terrestres (**Leitgib et al., 2007**). Ainsi, cette étude requiert ces deux approches pour évaluer l'écotoxicité des épandages de boues de STEP:

- l'impact sur l'écosystème aquatique : la lentille d'eau '*Lemna minor*', prise comme modèle (**ISO 20079:2005(F)**), est tout à fait adaptée à l'évaluation de la toxicité des lixiviats et permet ainsi de connaître le potentiel écotoxique réel des éléments dissouts apportés par les boues. La croissance reste le paramètre classique d'évaluation et repose sur le nombre de frondes observées.

- L'impact sur l'écosystème terrestre : L'escargot *Cantareus aspersus* (*Helix aspersa*) a été utilisé comme modèle pour étudier l'écotoxicité des sols amendés. En général, la position occupée par les escargots dans les écosystèmes terrestres intègre le sol, la plante et l'atmosphère (De Vaufleury *et al.*, 2009). Ces trois sources de contaminants confèrent aux escargots une disposition naturelle d'exposition à des doses élevées. Ainsi, la prédation de ce gastéropode terrestre, herbivore et détritivore, par de nombreux prédateurs (oiseaux, mammifères...) peut être à l'origine de transferts de contaminants dans la chaîne trophique (Laskowski et Hopkin, 1996a, 1996b). Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer les effets des épandages de boues de STEP sur la croissance des escargots ainsi que les transferts éventuels des ETM.

L'analyse de l'écotoxicité chez ces deux organismes modèles, appartenant à deux niveaux trophiques différents, permet une meilleure évaluation d'un éventuel risque représenté par les épandages de boues.

4.1. L'ECOTOXICITE AQUATIQUE : MODELE « LENTILLES D'EAU »

4.1.1. PREPARATION DES LIXIVIATS

Le test des lixiviats évalue particulièrement la quantité des substances hydro extractibles. Par ailleurs, la lixiviation de ces éléments dépend de plusieurs facteurs physiques, chimiques et environnementaux (pH, potentiel Redox, T °C, MO, porosité, ...). Cette approche permet de prévoir les différents scénarii des effets des épandages de boues de STEP sur l'écosystème aquatique. Une quantité de boues, calculée sur la base d'apports équivalents à 0; 0,4; 3; 10; 30 et 60 t MS ha⁻¹, a été ajoutée à un échantillon de sol de Mélisey. Ce mélange, ajusté avec de l'eau déminéralisée (le rapport liquide : solide est de 10 (100 g de MS pour 1 L d'eau)), a été agité en continu pendant 16 heures à température ambiante (24 ±1 °C). Les particules solides ont été éliminées par une simple décantation. Les lixiviats (surnageants) obtenus ont été utilisés pour réaliser l'essai.

4.1.2. LA MISE EN CULTURE

Les plantes ont été acclimatées dans deux bassines contenant un milieu de culture et maintenues pendant 10 jours dans un phytotron en conditions optimales (25 °C le jour, 20 °C la nuit, une hygrométrie à 70 % et 16 h sous un éclairage continu de 500 μmol m⁻² s⁻¹ avant l'expérience. Les lentilles d'eau présentent une croissance optimale lorsque le pH est compris entre 6,5 et 8,5. Ainsi, un essai supplémentaire a été réalisé en ajustant le pH à la valeur 6,5 afin d'évaluer l'impact des boues en dehors de celui du pH. Cinq réplicats ont été utilisés pour chaque traitement. Les plantes d'une taille uniforme (2 frondes par colonie) ont été sélectionnées pour l'expérience. Sept colonies ont été mises en culture dans des béciers contenant 150 mL de lixiviat. Les récipients ont été placés dans les mêmes conditions décrites ci-dessus pendant 7 jours. Les résultats sont exprimés en % d'inhibition ou de stimulation de croissance observée chez les plants témoins.

4.2. L'ECOTOXICITE TERRESTRE : MODELE « ESCARGOT »

Les escargots sont des organismes «bio-indicateurs» pertinents en écotoxicologie terrestre accumulant de fortes concentrations en métaux dans leurs tissus quand ils sont exposés aux sols contaminés soit par l'ingestion (détritux, végétation) ou par contact dermique (le pied). Les escargots utilisés au cours de ces expérimentations ont été élevés en laboratoire dans les conditions (température, humidité et photopériode) décrites par **Gomot-de-Vaufleury (2000)** (**Figure 19**).

Deux lots d'escargots calibrés ont été produits :

- i) Les juvéniles ($> 1 \pm 0,3g$) sont destinés aux expérimentations réalisées en conditions contrôlées (ISO 15952:2006) ;
- ii) Les sub-adultes ($> 5 \pm 0,5g$) vont être directement introduits dans les microcosmes implantés sur le site de Mélisey

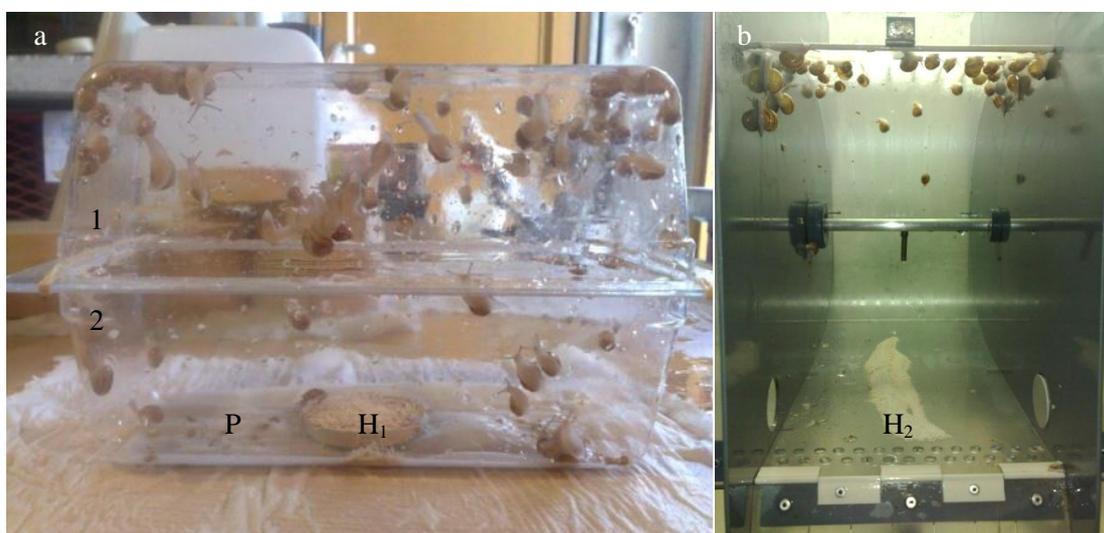


Figure 19 : a) Nursery : Boîtes à souris (1 et 2) empilées contenant des naissains : (P) un papier absorbant humide recouvre le fond. Le nettoyage et la nourriture (H_1) : Helixal[®] premier âge) sont effectués trois fois par semaine. b) Phase de croissance : Dans la cage d'élevage, les juvéniles sont nourris avec Helixal[®] deuxième âge (H_2) (**Gomot-de-Vaufleury, 2000**).

4.2.1. EN CONDITIONS CONTROLEES

Des escargots juvéniles ($>1 \pm 0,3g$) sont exposés pendant 28 jours à des sols amendés ou non par les boues de STEP dans des boîtes à souris en polystyrène cristal (E1DBBAC001, IFFA-CREDO, 69 L'Arbresle, France). Le dispositif est composé de deux boîtes empilées dont le volume unitaire est égal à 1600 cm^3 et de dimensions (24 x 10 x 8 cm). L'une des deux boîtes a été remplie de 1 kg MS de sol dont l'humidité est fixée à 70% de la capacité au champ. La deuxième est retournée pour servir de couvercle et afin d'augmenter aussi le volume pour éviter les effets du groupe. Parallèlement au témoin **CSCL** (*Control Soil and Control Lettuce*), deux modalités ont été définies : 1) La première **ASCL** (*Amended Soil and Control Lettuce*) considère le sol comme la seule source potentielle de contamination tandis que la deuxième **ASAL** (*Amended Soil and Amended Lettuce*) présente simultanément deux sources éventuelles de contamination (le sol et la laitue). Trois apports de boues (3, 30 et 60 t

MS ha⁻¹), par modalités, ont été appliqués aux sols (**Figure 20**). Chaque traitement est répété trois fois.

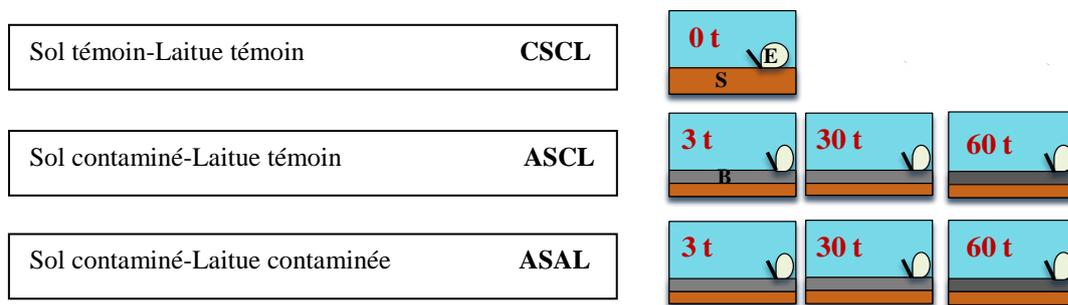


Figure 20 : Schéma du dispositif expérimental (S : sol, B : boues, E : escargots). Chaque traitement est répété trois fois.

La laitue (*Lactuca sativa*) croît difficilement sur les sols trop acides. Ainsi, les plantules obtenues sur le sol de Mélisey sont rabougries et robustes (**Figure 21a**). Par conséquent, la laitue témoin utilisée pour nourrir les escargots est achetée au commerce. La laitue cultivée sur les sols fertilisés par les boues (3, 30 et 60 t MS ha⁻¹) présente une meilleure croissance (**Figure 21b**) et elle a servi à nourrir les escargots selon les modalités expérimentales décrites ci-dessus (**Figure 20**).



Figure 21 : Culture de la laitue sur le sol de Melisey : a) sol témoin, b) sol amendé (30 t MS ha⁻¹).

12 escargots ont été introduits dans chaque boîte (**Figure 22**). Durant l'expérience, ils sont humidifiés et nourris trois fois par semaine. La masse fraîche totale des escargots et le diamètre de la coquille ont été suivis pour l'ensemble des escargots après 7, 14 et 28 jours d'exposition. Après chaque durée d'exposition, quatre individus ont été prélevés et stockés à -80 °C. Après décongélation, le corps mou est retiré de la coquille, pesé et lyophilisé. La masse sèche et la masse de la coquille sont déterminées. Les teneurs en ETM ont été évaluées dans le corps entier des escargots (deux individus par boîte), la couche superficielle du substrat en contact avec l'escargot, ainsi que la laitue qui a servi pour les nourrir.

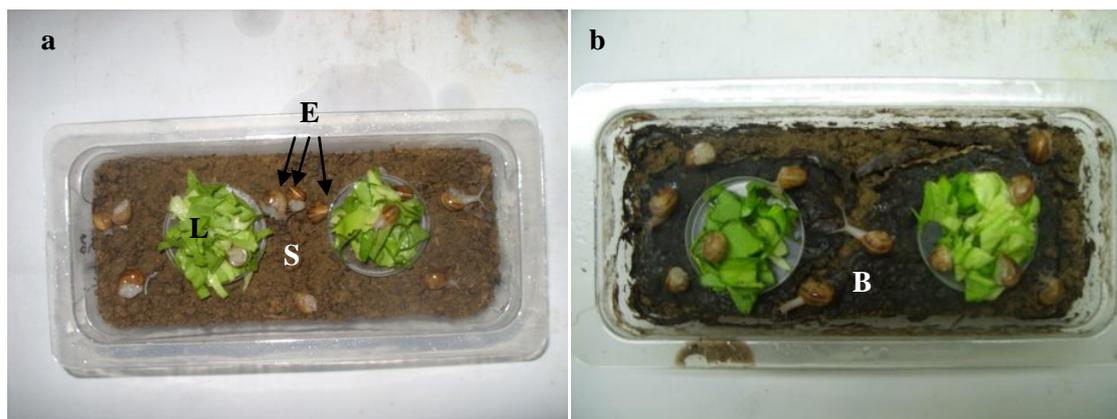


Figure 22 : Exposition des escargots au sol témoin (a) et au sol amendé (b). (S : sol, B : boues, L : laitues, E : escargots).

4.2.2. EN CONDITIONS NATURELLES

En septembre 2010, des escargots sub-adultes ($> 5 \pm 0,3$ g) ont été placés *in situ* (**Figure 23**) dans des microcosmes à raison de 3 cages de 10 individus par sous-placette (B'3, B'4, B'5, T'3 et T'4) (**Figure 12**). Ils ont été pesés frais avant exposition. Deux prélèvements ont été réalisés après 14 et 28 jours avec respectivement 4 et 6 escargots. Les mesures de la masse des escargots (masse fraîche, masse sèche et masse de la coquille) ont porté sur l'ensemble des individus tandis que les teneurs en ETM (Pb, Cd, Cu et Zn) n'ont été effectués que sur 2 individus par prélèvement et par microcosme. La litière (L), l'horizon minéral sous-jacent (S) et la végétation ont été échantillonnés et analysés.



Figure 23 : a) Microcosmes installés dans une sous-placette, b) Vue interne d'un microcosme : (M) : microcosmes, (A) : deux morceaux de tuiles servant d'abris aux escargots, (E) : escargots.

5. LES ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats présentés correspondent aux moyennes \pm l'erreur standard obtenus à partir d'analyses d'échantillons indépendants avec n qui varie de 5 à 18. Les mesures réalisées au cours des différentes expériences ont été évaluées par une analyse de variance one-way ANOVA suivi d'un test t ou d'une comparaison multiple de moyennes effectuées par le test de Tukey « Tukey's Multiple Comparison Test ». Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives (*). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, San Diego, Californie, USA).

Chapitre I

**Épandage de boues de station d'épuration en
parcelles boisées :**

Quels impacts sur le sol ?

Dans cette étude, on s'intéressera tout d'abord aux effets en conditions contrôlées de l'apport de boues sur les propriétés physico-chimiques du sol et sur sa teneur en éléments majeurs ainsi qu'en éléments traces métalliques. Dans un deuxième temps, ces paramètres seront mesurés *in situ* sur le terrain d'étude.

1. ETUDE AU LABORATOIRE

1.1. LE pH

Quelle que soit la durée de culture, le pH des résidus de boues varie autour de 5,6 à 6,4 (**Tableau 8**). Après un mois et demi d'épandage de boues, le pH de l'horizon supérieur augmente légèrement (**Figure 24**) et passe de 4,9 à 5,4 pour le traitement B2. Cette augmentation reste non significative. En revanche, une acidification de l'horizon supérieur des pots amendés s'observe à partir de 3 mois de culture et s'accroît progressivement pour atteindre finalement les alentours de 4,5 après 12 mois de culture. Le pH de l'horizon inférieur des pots amendés ou non fluctue légèrement autour de cette valeur quelle que soit la durée de culture. A 18 mois de culture (saison hivernale extérieure), aucune différence de pH n'est observée ni entre les horizons ni entre les traitements.

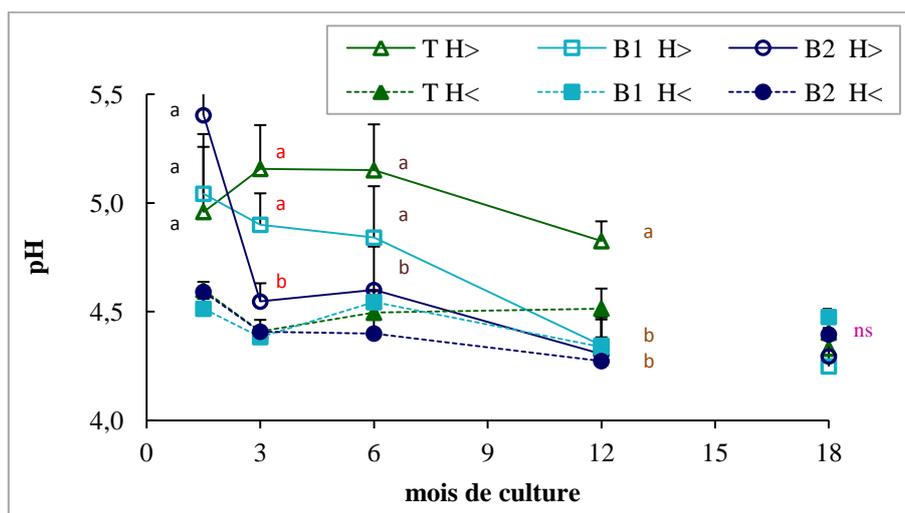


Figure 24 : Variations du pH de l'horizon supérieur (H>) et inférieur (H<) du pot en fonction du temps de culture. Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). Les lettres indiquent les différences significatives entre les H> des différents traitements (T : Témoin ; B1 : 30 t MS ha⁻¹ et B2 : 60 t MS ha⁻¹) d'une même récolte.

Tableau 8 : Evolution du pH des résidus de boues formés à la surface du pot (moyenne ± écart-type ; n=5) ; ***Différence significative à p<0,001 entre B1 et B2.

pH	1,5 mois	3 mois	6 mois	12 mois	18 mois
B1	6,4 ± 0,1	5,9 ± 0,0	5,6 ± 0,2	5,8 ± 0,1	5,9 ± 0,2
B2	6,2 ± 0,1 ***	5,8 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,6 ± 0,1	5,7 ± 0,1

1.2. LE POTENTIEL REDOX

On a mesuré le potentiel redox (Eh) avant chaque récolte (**Figure 25**). Quel que soit le traitement, la valeur d'Eh varie légèrement autour de 400 mV. Ce qui correspondrait aux caractéristiques d'un sol bien aéré. L'apport des boues n'a donc pas modifié ce paramètre.

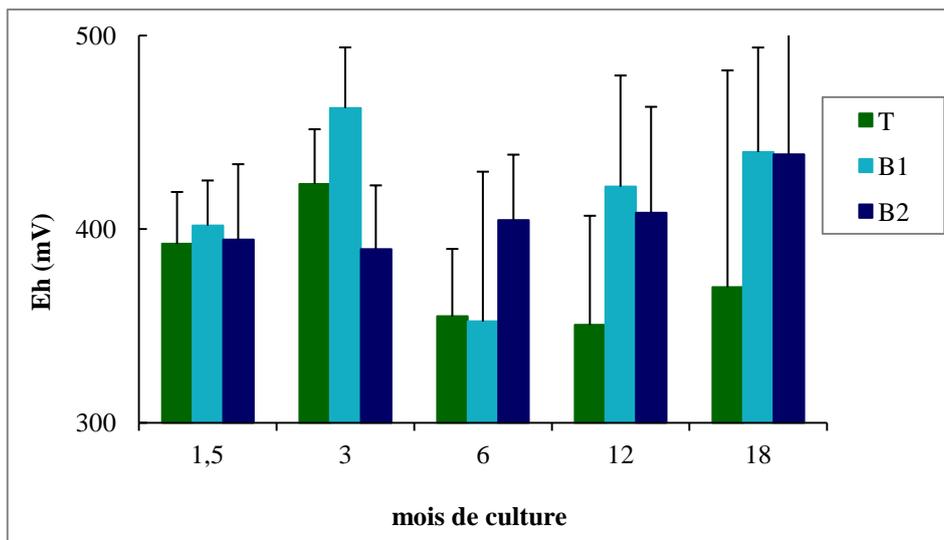


Figure 25 : Variations du potentiel d’oxydoréduction (Eh) en fonction de la durée de culture. Les mesures ont été effectuées juste avant le dépotage (T : Témoin ; B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹). Les barres d’erreur représentent les écart-types (n=5). Aucune différence significative n’a été détectée.

1.3. L’AZOTE TOTAL ET LE RAPPORT C/N

L’enrichissement des pots B1 et B2 en azote par l’épandage de boues représente respectivement environ 42 % et 84 % du stock initial en azote total. Dans cette étude, l’apport de boues conduit à une augmentation significative de la teneur en azote total de l’horizon supérieur des pots (**Figure 26**). Ce résultat est proportionnel à la dose de boues apportée et ne change pas significativement au cours de la période de culture. En parallèle, cet apport n’a pas modifié la teneur en azote total de l’horizon inférieur. Celle-ci reste similaire à celle de l’horizon supérieur du témoin.

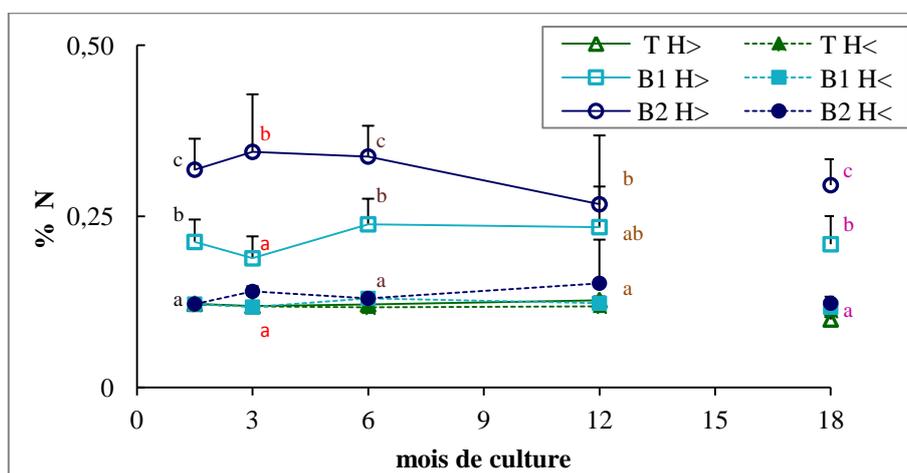


Figure 26 : Effet de l’épandage de boue sur les teneurs en azote (%N) au niveau de l’horizon supérieur (H>) et inférieur (H<) du pot durant les différentes durées de culture (T : Témoin ; B1 :30 t MS ha⁻¹ et B2 : 60 t MS ha⁻¹). Les barres d’erreurs représentent les écart-types (n=5). Pour la même récolte, les moyennes de l’horizon supérieur (H>) qui n’ont pas la même lettre sont significativement différentes à p<0,05.

Le % d'azote retenu dans les résidus des boues (Rb) est nettement plus important (**Tableau 9**). A 18 mois de culture, 50 % de la teneur initiale des boues (7,2 %) sont encore piégés dans ces résidus secs riches en matière organique. Au départ (1,5 mois), Ce compartiment présente des valeurs plus faibles (1,5 et 2,3 pour B1 et B2 respectivement). Il est possible que durant les premiers mois de culture, les fragments de boues retiennent par contact une fraction de sol qui représente une masse sèche non négligeable dont on n'a pas tenu compte lors des prélèvements.

Tableau 9 : Teneurs en % d'azote des résidus de boues (Rb) formés en surface du pot (moyenne± écart-type ; n=5). Pour la même récolte, les moyennes de B1 et B2 qui sont différentes significativement sont marquées par des astérisques (** p<0,01 et *** p<0,001).

	1,5 mois	3 mois	6 mois	12mois	18 mois
B1	1,5 ± 0,4	2,0 ± 0,3	0,8 ± 0,2	2,3 ± 0,6	3,6 ± 0,9
B2	2,3 ± 0,4**	2,5 ± 0,5	1,8 ± 0,3***	2,6 ± 0,5	3,6 ± 0,4

L'analyse du rapport C/N montre une baisse hautement significative (p<0,001) au niveau de l'horizon supérieur (H>) des pots après l'application des boues (**Tableau 10**). Ce rapport a diminué en moyenne de 35,8 % et 47,7 % chez B1 et B2 respectivement lors de la première récolte et de 23,3 % et 31,7 % après 18 mois de culture.

Tableau 10 : Effet de l'apport de boues sur la dynamique du rapport C/N (moyenne± écart-type ; n=5). Pour la même récolte, les astérisques représentent les différences significatives des traitements avec le témoin (*p<0,05 ; ** p<0,01 et *** p<0,001).

Durée de culture mois	Horizons	C/N		
		Témoin	B1	B2
1,5	Rb	-	6,6 ± 0,1	6,2 ± 0,0
	H>	17,6 ± 1,6	11,3 ± 1,8***	9,2 ± 0,7***
	H<	17,9 ± 1,6	17,1 ± 1,1	16,8 ± 0,9
3	Rb	-	6,9 ± 0,3	6,4 ± 0,1
	H>	17,9 ± 1,1	12,2 ± 1,1***	9,2 ± 0,6***
	H<	16,9 ± 1,1	17,2 ± 0,7	13,8 ± 0,5***
6	Rb	-	8,7 ± 0,4	7,41 ± 0,38
	H>	16,6 ± 0,6	11,8 ± 0,6***	9,87 ± 0,45***
	H<	16,1 ± 0,3	16,1 ± 0,4	15,15 ± 0,39*
12	Rb	-	7,6 ± 0,2	7,3 ± 0,2
	H>	17,1 ± 1,2	12,5 ± 1,3***	11,4 ± 2,4***
	H<	15,7 ± 0,4	15,8 ± 0,9	14,2 ± 1,9
18	Rb	-	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,1
	H>	16,7 ± 0,3	12,8 ± 1,7***	11,4 ± 1,1***
	H<	16,2 ± 0,2	17,0 ± 0,7	17,4 ± 0,9

Toutefois, l'apport de 60 t MS ha⁻¹ a entraîné une chute de C/N de l'horizon inférieur (H<) d'une manière hautement significative (p<0,001) à 3 mois de culture et significative (p<0,05) à 6 mois de culture. Ce résultat indique une mobilisation de C et/ou de N vers cet horizon. Excepté ces deux cas, l'horizon inférieur ne manifeste aucune modification par rapport au témoin pour les deux traitements B1 et B2. Les valeurs restent stables et similaires à celles de l'horizon supérieur du témoin.

Les rapports les plus faibles sont fournis par les résidus de boues formés en surface du sol chez B1 et B2. Ces débris renferment des teneurs élevées en matière organique totale apportée par les boues liquides.

1.4. LE PHOSPHORE

A partir de 6 mois de culture, la teneur en P total de l'horizon supérieur des pots B1 et B2 est significativement supérieure à celle des pots T et proportionnelle à la quantité des boues épandues (**Figure 27**). De plus, la concentration de cet élément augmente dans cet horizon d'une manière significative entre 3 et 6 mois et entre 12 et 18 mois de culture (**Annexe 3**). Après 18 mois de culture, les pots B1 et B2 présentent, des teneurs respectivement multipliées par 8 et 15 fois en comparaison avec celles des pots témoins. La teneur en P présente au niveau de l'horizon inférieur n'a pas été modifiée et reste similaire à celle mesurée au niveau horizon supérieur T.

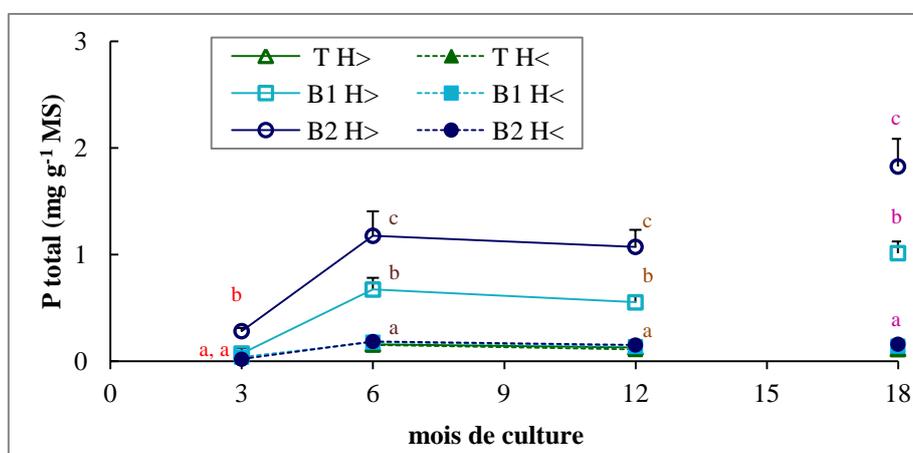


Figure 27 : Variations des teneurs en P total ($\text{mg g}^{-1}\text{MS}$) de l'horizon supérieur (H>) et inférieur (H<) du pot en fonction de la durée de culture après épandage (T : Témoin ; B1 : 30 t MS ha^{-1} et B2 : 60 t MS ha^{-1}). Les barres d'erreurs représentent les écart-types ($n=5$). Pour la même récolte, les moyennes de l'horizon supérieur (H>) qui n'ont pas la même lettre sont significativement différentes à $p<0,05$.

La teneur en P total des résidus des boues (Rb) croît progressivement et se stabilise à partir de 12 mois de culture (**Tableau 11**) en renfermant environ 65 % de la teneur initiale des boues liquides ($15,51 \text{ mg g}^{-1}$). Les valeurs plus faibles après 3 et 6 mois de culture s'expliqueraient par la quantité importante du sol adhérente aux agrégats des boues (Rb) et qui pourrait engendrer un phénomène de dilution.

Tableau 11 : Teneurs en P total des résidus de boues formés en surface du pot ($\text{mg g}^{-1}\text{MS}$) (moyenne \pm écart-type ; $n=5$) ; ***Différences significative entre B1 et B2 de la même récolte à $p<0,001$.

P	3 mois	6 mois	12mois	18 mois
B1	$1,7 \pm 1,0$	$2,2 \pm 0,5$	$10,2 \pm 0,7$	$10,1 \pm 1,7$
B2	$2,5 \pm 1,4$	$5,3 \pm 0,9^{***}$	$9,2 \pm 0,8$	$10,3 \pm 1,0$

1.5. LE POTASSIUM

Le sol utilisé lors de cette expérimentation est pauvre en K, cependant l'épandage des boues liquides ne l'enrichit que de 2,8 et 5,6 % pour B1 et B2 respectivement. La distribution du K est présentée à la **Figure 28**. Durant toutes les durées de culture, les teneurs moyennes des deux horizons fluctuent légèrement autour de la valeur initiale de la teneur du sol ($1,6 \text{ mg g}^{-1}$) quel que soit le traitement. Cependant, on note une diminution significative qui se manifeste dans les pots après 18 mois de culture quel que soit l'horizon (**Annexe 3**).

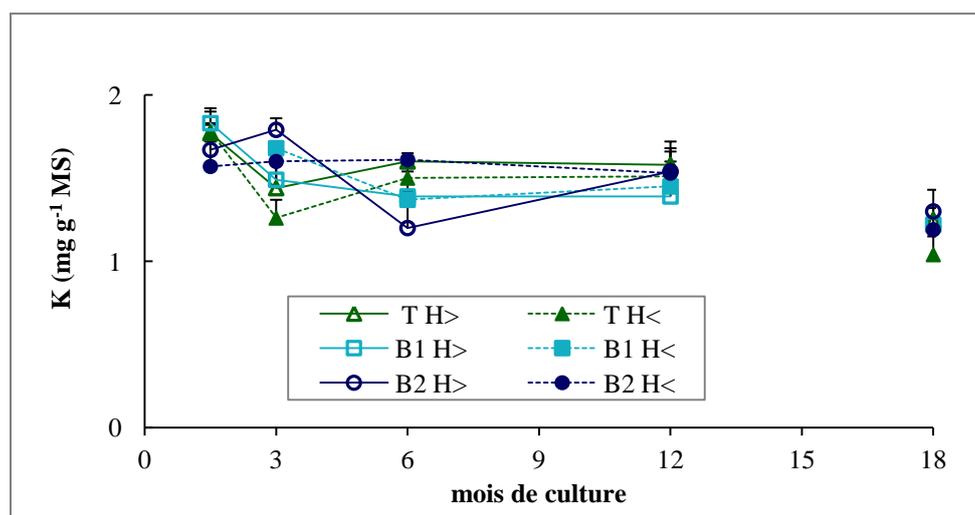


Figure 28 : Variations des teneurs en K ($\text{mg g}^{-1}\text{MS}$) de l'horizon supérieur (H>) et inférieur (H<) du pot durant les différentes durées de culture après l'application des boues (T : Témoin ; B1 : 30 t MS ha^{-1} et B2 : 60 t MS ha^{-1}). Les barres d'erreurs représentent les écart-types ($n=5$).

Les résidus des boues montrent une réduction progressive de la teneur en K (**Tableau 12**). Le taux de perte est respectivement 47 et 40 % pour B1 et B2.

Tableau 12 : Teneurs en K total des résidus de boues formés en surface du pot ($\text{mg g}^{-1}\text{MS}$) (moyenne \pm écart-type ; $n=5$) :

K	1,5 mois	3 mois	6 mois	12mois	18 mois
B1	$2,3 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
B2	$2,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$

1.6. LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX (EM)

Les boues apportées étaient pauvres en Mg, Mn, Na et en Ca. Cependant, les « débris » desséchés des boues en surface des pots contiennent un peu plus de ces EM que le sol initial (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Teneurs en Mg, Mn, Na et Ca des résidus de boues formés en surface du pot (mg g⁻¹MS) (moyenne± écart-type ; n=5) :

Eléments mg g ⁻¹ MS		Durée de culture (mois)				
		1,5	3	6	12	18
Mg	B1	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,8 ± 0,2	3,4 ± 0,4
	B2	2,6 ± 1,5	3,1 ± 0,2	2,6 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,3
Mn	B1	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,41 ± 0,11	0,6 ± 0,12
	B2	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,37 ± 0,11	0,49 ± 0,05	0,6 ± 0,05
Na	B1	0,28 ± 0,07	0,30 ± 0,07	0,11 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,02 ± 0,02
	B2	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,19 ± 0,06	0,22 ± 0,04	0,01 ± 0,02
Ca	B1	3,4 ± 0,8	6,1 ± 0,5	2,7 ± 0,5	8,5 ± 2,1	10,6 ± 2,2
	B2	4,5 ± 0,7	6,1 ± 0,9	5,5 ± 1,4	8,7 ± 1,6	9,5 ± 1,1

Il ressort de la **Figure 29** que l'apport de ces boues ne modifie pas notablement les teneurs de ces éléments dans les deux horizons du sol quels que soient le traitement et la durée de culture. Toutefois, les teneurs en calcium de l'horizon supérieur demeurent légèrement au-dessus de celles de l'horizon inférieur quel que soit le traitement (B1 et B2).

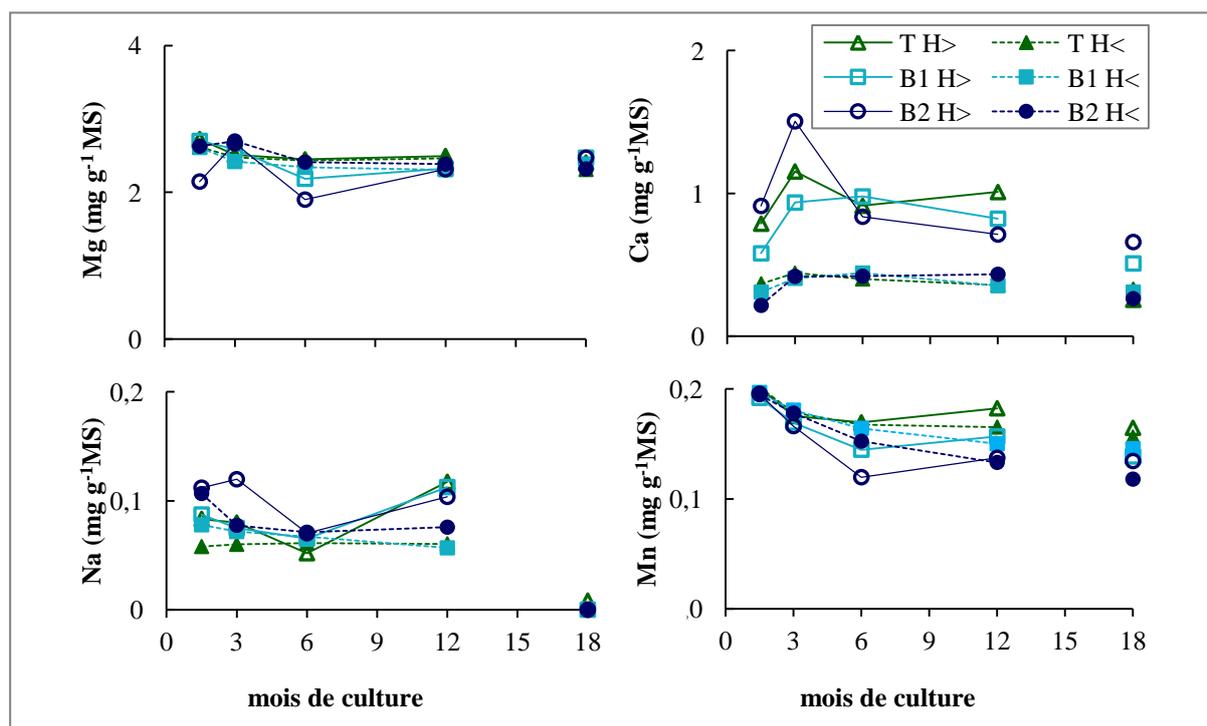


Figure 29 : Variations des teneurs en éléments minéraux : Mg, Ca, Na et Mn (mg g⁻¹MS) de l'horizon supérieur (H>) et inférieur (H<) du pot durant les différentes durées de culture après l'application des boues (T : Témoin ; B1 : 30 t MS ha⁻¹ et B2 : 60 t MS ha⁻¹) (n=5). Aucune différence significative n'a été détectée.

A 18 mois de culture, on remarque un épuisement de la réserve en Na des pots, ainsi, les teneurs deviennent presque nulles dans tous les horizons même dans les résidus des boues. Vraisemblablement, le faible stock a été épuisé par lixiviation après la mise en place des pots à l'extérieur.

1.7. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES (ETM)

1.7.1. LE CUIVRE ECHANGEABLE

Comparé au témoin T, le sol de l'horizon de surface du traitement B2 présente des teneurs significativement élevées en cuivre échangeable quelle que soit la durée de culture (**Tableau 14**). En 6 mois de culture, le traitement B1 manifeste une augmentation hautement significative de cet horizon jusqu'à la fin de l'expérimentation. Il a été constaté que la quantité du cuivre échangeable est proportionnellement liée à la dose appliquée et le facteur d'enrichissement varie entre 1,5 et 41,6 pour B1 et entre 1,9 et 53,3 pour B2.

Les teneurs de l'horizon inférieur restent similaires à celles du témoin à l'exception de la récolte à 6 mois de culture. Celle-ci reflète une hausse significative de l'ordre de 55 et 355 % respectivement pour B1 et B2. Dans les résidus des boues, cette fraction de cuivre biodisponible représente entre 0,15 et 6,4 % du cuivre total.

Tableau 14 : Teneurs en cuivre échangeable des résidus de boues formés en surface du pot ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$) (moyenne \pm écart-type ; n=5). Les astérisques représentent les différences significatives entre les traitements comparés au témoin pour la même récolte (*p<0,05 ; **p<0,01 et ***p<0,001).

Durée de culture (mois)	Horizons	Cuivre échangeable ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$)		
		Témoin	B1	B2
1,5	Rb	-	4,92 \pm 1,35	9,72 \pm 3,62
	H>	0,15 \pm 0,19	0,26 \pm 0,04	0,52 \pm 0,15 **
	H<	0,13 \pm 0,04	0,18 \pm 0,11	0,13 \pm 0,03
3	Rb	-	18,80 \pm 6,75	22,99 \pm 2,77
	H>	0,03 \pm 0,04	0,23 \pm 0,14	1,58 \pm 0,74 *
	H<	nd	nd	0,03 \pm 0,01
6	Rb	-	4,25 \pm 0,78	11,13 \pm 3,42
	H>	0,03 \pm 0,02	1,25 \pm 0,29	1,60 \pm 0,17 ***
	H<	0,09 \pm 0,01	0,14 \pm 0,03 **	0,41 \pm 0,02 ***
12	Rb	-	12,61 \pm 5,91	14,83 \pm 4,44
	H>	0,31 \pm 0,06	0,72 \pm 0,39 **	1,01 \pm 0,60 ***
	H<	0,75 \pm 0,31	0,23 \pm 0,37	0,71 \pm 0,30
18	Rb	-	11,44 \pm 6,94	7,23 \pm 1,28
	H>	0,71 \pm 0,27	1,04 \pm 0,14 **	1,37 \pm 0,23 ***
	H<	0,40 \pm 0,23	0,64 \pm 0,29	0,25 \pm 0,07

1.7.2. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES TOTAUX

Les évolutions des concentrations en ETM (Cu, Zn, Pb et Cd) sont représentées dans la **Figure 30** et dans le **Tableau 15**. Les teneurs élevées en Zn dans le sol de Mélisey sont d'origine géochimique. Les boues utilisées au cours de cette étude présentent une forte concentration en Cu et en Zn. Toutefois, ces teneurs sont en dessous des limites autorisées pour un plan d'épandage.

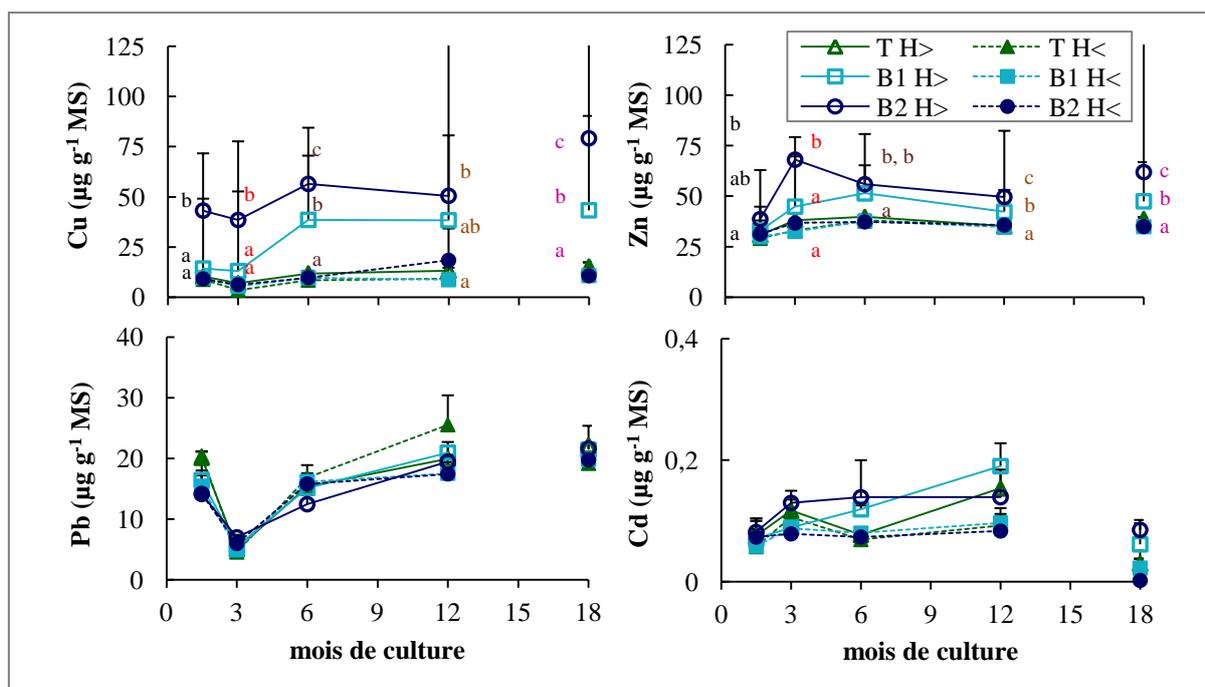


Figure 30 : Variations des teneurs en éléments trace métalliques : Cu, Zn, Pb et Cd ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$) de l'horizon supérieur (H>) et inférieur (H<) du pot durant les différentes durées de culture après l'application des boues (T : Témoin ; B1 : 30 t MS ha^{-1} et B2 : 60 t MS ha^{-1}). Les barres d'erreurs représentent les écart-types ($n=5$). Pour la même récolte, les moyennes de l'horizon supérieur (H>) qui n'ont pas la même lettre sont significativement différentes à $p<0,05$.

Les concentrations en Cu et en Zn de l'horizon supérieur augmentent significativement avec l'apport des boues. Cette augmentation est proportionnelle à la dose de boues appliquée. Cependant, les différences entre les récoltes d'un même traitement ne sont globalement pas significatives, ce qui s'explique par la forte hétérogénéité se révélant par un écart-type important. Par contre, l'horizon inférieur ne semble pas affecté par l'épandage des boues. Les teneurs en ETM restent au niveau des concentrations mesurées initialement dans le sol témoin.

L'apport des boues n'a pas modifié les teneurs en Pb du sol au niveau des deux horizons après 1,5 ; 6 et 18 mois. Les valeurs obtenues sont proches de la teneur initiale du sol utilisé ($13\ \mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$). Par contre, l'évolution de cet élément montre une chute d'environ 60 % à 3 mois de culture quels que soient l'horizon et le traitement. Ce résultat pourrait être dû à une erreur d'analyse des échantillons de cette récolte.

Quels que soient le traitement, l'horizon et la durée de culture, les boues n'ont pas affecté significativement les concentrations en Cd. Cependant, les valeurs enregistrées dans l'horizon supérieur des traitements B1 et B2 tendent à augmenter par rapport à celles mesurées au niveau de l'horizon supérieur témoin. Celles-ci restaient très stables autour de $0,08\ \mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$ à l'exception de la récolte de 18 mois où une baisse significative est induite quel que soit le traitement.

Les teneurs totales en ETM des agrégats des boues augmentent considérablement entre 1,5 et 18 mois de culture. Les facteurs d'enrichissement sont compris entre 2,9 et 5,3 (Tableau 15).

Tableau 15 : Teneurs en ETM des résidus de boues formés en surface du pot ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$) (moyenne \pm écart-type ; n=5). Pour la même récolte, les astérisques représentent les différences significatives entre les traitements (* $p<0,05$; ** $p<0,01$ et *** $p<0,001$).

Eléments		Durée de culture (mois)				
		1,5	3	6	12	18
Cu	B1	224,0 \pm 57,3	294,8 \pm 64,6	165,9 \pm 45,9	530,9 \pm 128,5	944,9 \pm 172,7
	B2	332,9 \pm 54,0**	373,9 \pm 85,0	411,3 \pm 68,2***	621,6 \pm 119,2	963,7 \pm 111,2
Zn	B1	134,2 \pm 30,0	275,1 \pm 24,9	135,7 \pm 29,4	543,36 \pm 40,1	608,4 \pm 100,9
	B2	188,7 \pm 26,1**	302,8 \pm 51,7	284,3 \pm 54,1***	486,6 \pm 35,9*	604,7 \pm 63,8
Pb	B1	14,9 \pm 5,1	12,7 \pm 5,4	20,1 \pm 1,5	28,2 \pm 2,8	44,2 \pm 4,8
	B2	14,6 \pm 2,4	14,1 \pm 4,9	22,9 \pm 4,1	50,9 \pm 3,0***	43,2 \pm 4,0
Cd	B1	0,27 \pm 0,08	0,57 \pm 0,1	0,36 \pm 0,06	1,11 \pm 0,29	1,44 \pm 0,23
	B2	0,35 \pm 0,07	0,47 \pm 0,2	0,37 \pm 0,08	1,07 \pm 0,11	1,21 \pm 0,07

2. ETUDE SUR LE TERRAIN

Dans le cadre de cette partie, l'étude du sol sera menée en particulier sur deux horizons : litière (L) et l'horizon minéral sous-jacent (S).

2.1. LE pH

La valeur moyenne du pH des deux horizons : litière (L) et sol (S) avant l'apport de boues était de 4,5. L'apport de 3 t MS ha⁻¹ de boues liquides, en mars 2010, a provoqué une augmentation significative du pH de la litière. Cette augmentation est de l'ordre de 1,5 unité. Néanmoins, elle n'était que temporaire puisque 2 mois après l'épandage, le pH est retombé plus ou moins à sa valeur initiale (**Figure 31**). Le pH de l'horizon S des parcelles épandues, varie peu et reste similaire dans les deux horizons témoins (T'L et T'S).

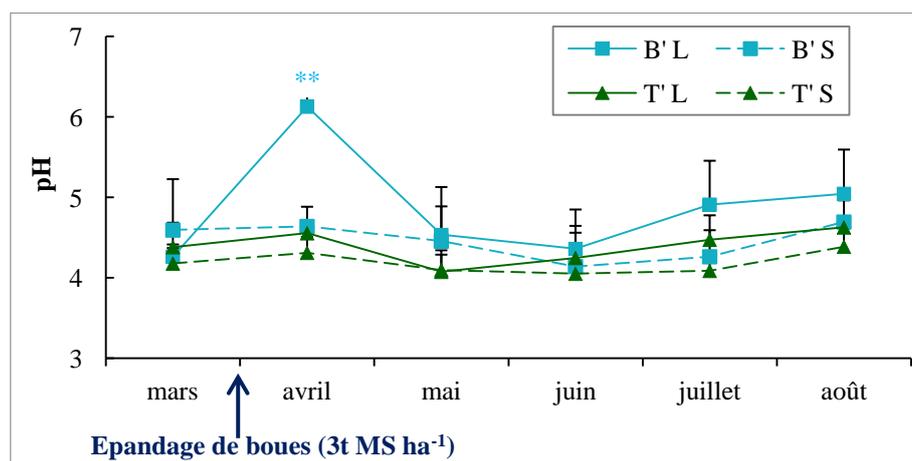


Figure 31 : Variations du pH de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral (S) après l'apport de boues (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n=5). ***Différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement à $p<0,001$.

2.2. L'AZOTE KJELDAHL ET L'AZOTE MINERAL

Dans le cas des apports modérés des boues (3 t MS ha⁻¹ an⁻¹) en milieu forestier, la teneur en N Kjeldahl (N_k) a tendance à augmenter dans l'horizon litière des parcelles amendées

(Figure 32). Un mois après l'épandage, cet enrichissement est maximal et est 2 fois plus élevé, comparé au témoin (T'L) puis les teneurs en N_k baissent progressivement. Cependant, compte tenu de la forte hétérogénéité observée, aucune différence significative n'a été déterminée.

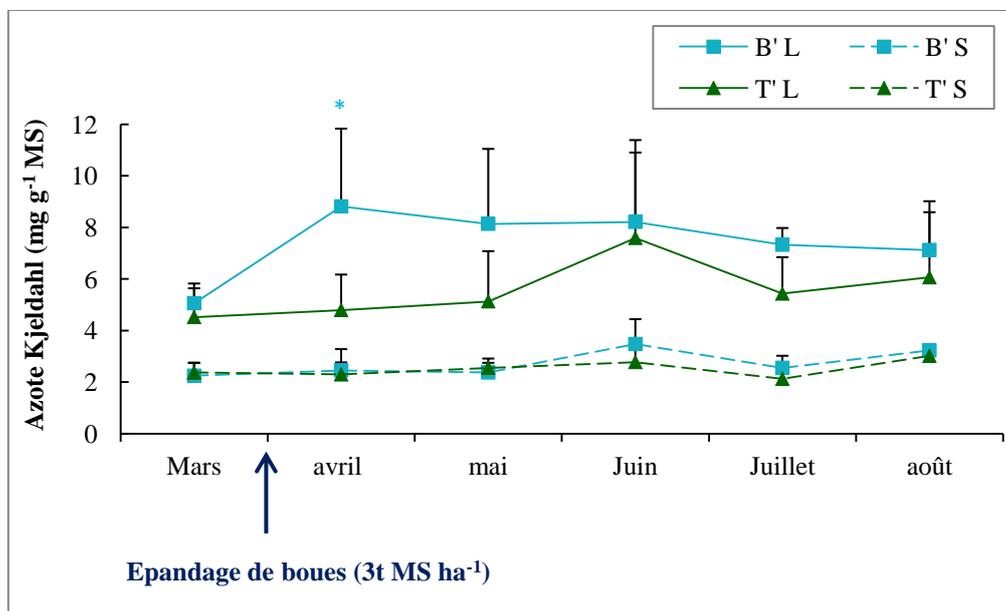


Figure 32 : Variations de l'azote Kjeldahl au niveau de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). *Différences significatives entre traitement d'un même prélèvement à p<0,05.

Pour connaître l'évolution de l'azote dans le sol, il est nécessaire de compléter le dosage d'azote total par le dosage d'azote minéral (NO_2^- ; NO_3^- ; NH_4^+). Dans la litière des parcelles traitées (B'L), les nitrates évoluent d'une façon similaire à celle de l'ammonium (**Figure 33**). Les courbes d'évolution montrent deux pics significativement différents par rapport au témoin. A chaque baisse, les valeurs reviennent au niveau initial. Un mois après épandage, les teneurs en nitrate et en ammonium dans B'L sont cinq fois supérieures à celles mesurées dans T'L. Le deuxième pic enregistré en juin montre des valeurs supérieures à celles obtenues en avril (juste après épandage). Ainsi, les teneurs maximales des nitrates et d'ammonium sont respectivement 3,75 fois et 1,65 fois supérieures dans la litière des parcelles amendées (B'L) comparé à la litière témoin (T'L). Les variations des teneurs en différentes formes d'azote de l'horizon (S) sont très faibles. Quel que soit le traitement, aucune différence significative n'a été enregistrée. Toutefois, les teneurs en nitrates de l'horizon B'S évoluent légèrement en parallèle avec celles de l'horizon B'L. Les nitrites ont été inférieurs au seuil de détection dans les deux horizons.

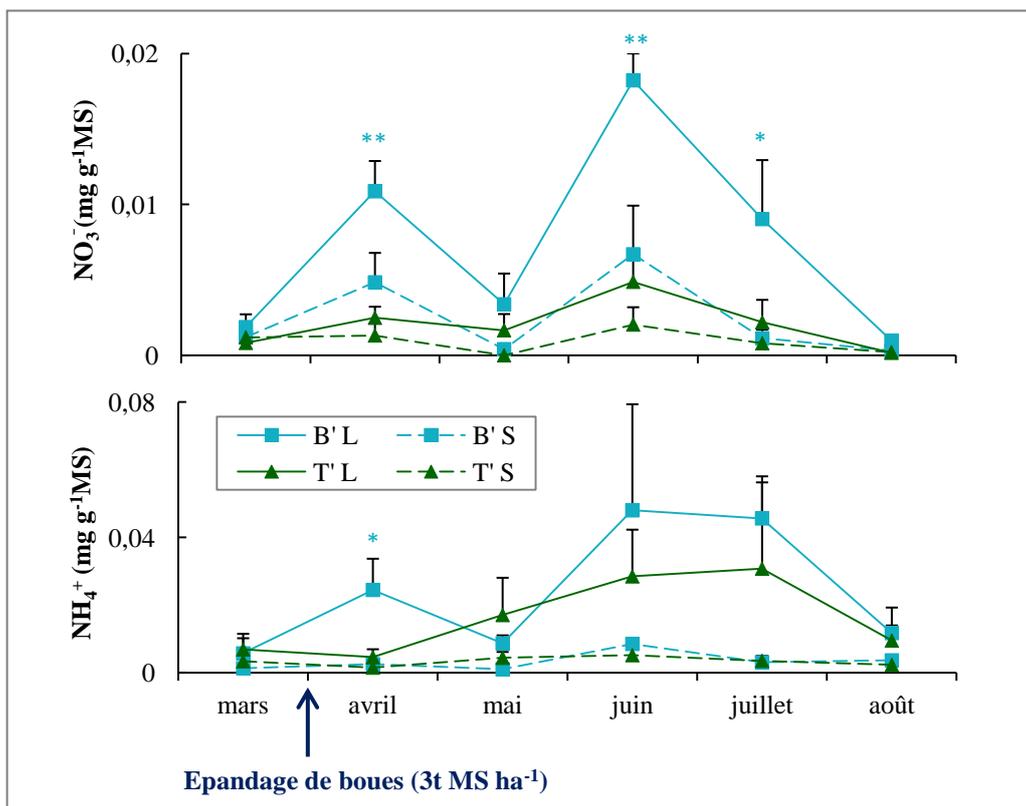


Figure 33 : Variation de de l'azote minéral (nitrate et ammonium) au niveau de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral sous-jacent (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha⁻¹). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n=5). Différences significatives entre traitement d'un même prélèvement *p<0,05 et ** p<0,01.

2.3. LE PHOSPHORE ET LE POTASSIUM

Comparé au témoin T'L, la teneur en phosphore total augmente significativement dans l'horizon B'L dès l'apport des boues (**Figure 34a**). Cette valeur est maximale (1,4 mg g⁻¹ MS) au premier prélèvement après l'épandage. Elle est 4,5 fois plus élevée comparé au témoin et s'atténue progressivement pour atteindre 0,68 mg g⁻¹ à la fin du suivi. Les boues n'ont pas d'effet significatif sur les teneurs en P total de l'horizon minéral sous-jacent. Au cours du temps, les valeurs restent stables autour de 0,2 mg g⁻¹ MS. Les teneurs en P total dans la litière témoin (T'L) ne diffèrent que légèrement de celles obtenues dans l'horizon minéral des deux traitements (B'S et T'S). Quels que soient l'horizon, le temps de prélèvement et le traitement, les teneurs en en K sont similaires et présentent les mêmes tendances (**Figure 34b**). Les moyennes fluctuent entre 0,73 et 1,45 mg g⁻¹ MS.

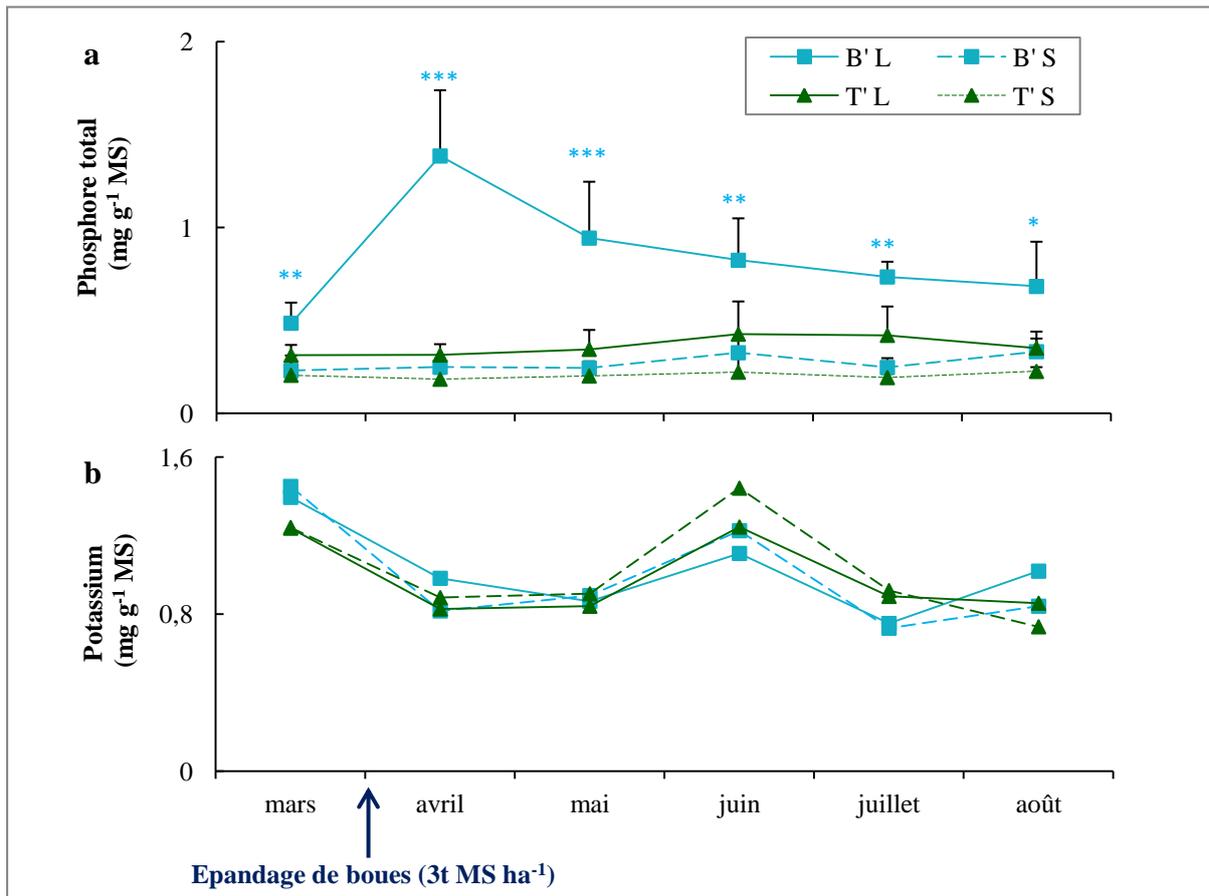


Figure 34 : Variations des teneurs (a) en P total et (b) en K ($\text{mg g}^{-1} \text{MS}$) de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha^{-1}). Les barres d'erreurs représentent les écart-types ($n=5$). Différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement à * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Aucune différence significative n'a été détectée pour le K.

2.4. LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX

Après l'application des boues, les teneurs en Ca de la litière (B'L) restent significativement plus élevées par rapport au témoin (T'L) durant deux mois puis diminuent progressivement (**Figure 35**). Comparé au T'L, l'enrichissement a atteint 162 et 183 % respectivement en avril et en mai. Par contre, les teneurs de l'horizon minéral restent stables et similaires. L'apport des boues n'affecte pas les teneurs du sol en Mg, Mn et Na quels que soit le traitement, l'horizon et la durée de culture.

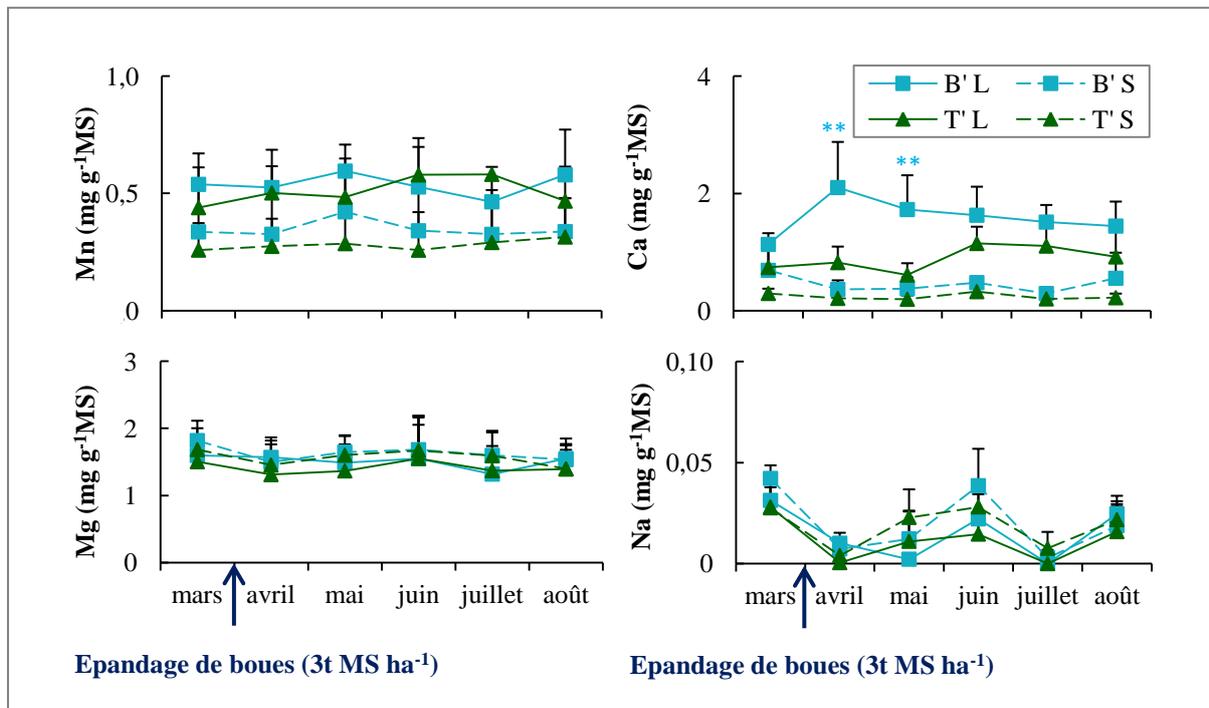


Figure 35 : Variations des teneurs en éléments minéraux: Mn, Ca, Mg et Na (mg g⁻¹MS) de l'horizon litière (L) et de l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha⁻¹). Les barres d'erreurs et les astérisques représentent respectivement les écart-types (n=5) et les différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement (*p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001).

2.5. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

2.5.1. LE CUIVRE ECHANGEABLE

L'horizon litière (B'L) montre un enrichissement temporaire en Cu échangeable après l'application des boues (**Figure 36**). La teneur moyenne des quatre prélèvements successifs (avril-juillet) est de 0,9 µg g⁻¹ MS. Excepté le premier prélèvement après épandage, les écart-types importants indiquent une grande hétérogénéité qui altère la significativité de ces mesures. Les boues affectent légèrement l'horizon minéral. Ses modifications ne sont pas significatives, ainsi, les teneurs en cette fraction soluble restent similaires à celles du témoin.

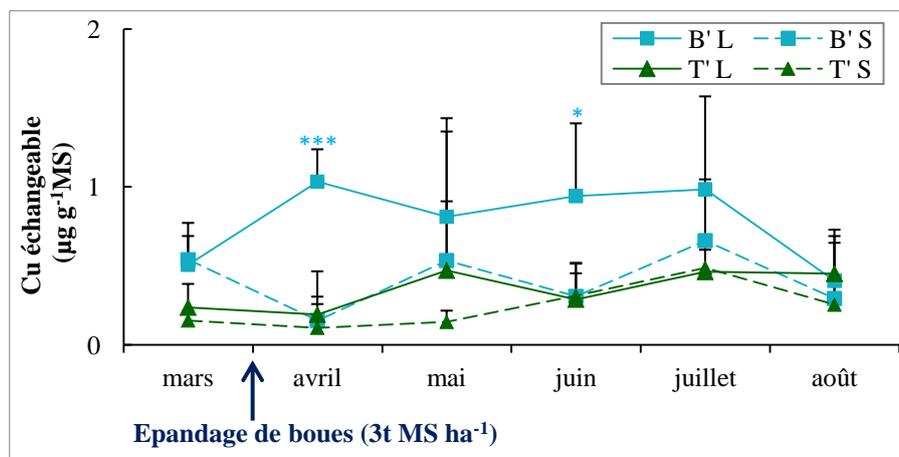


Figure 36 : Variations des teneurs en Cu²⁺ échangeable (µg g⁻¹MS) de l'horizon litière (L) et l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha⁻¹). Les barres d'erreurs et les astérisques représentent respectivement les écart-types (n=5) et les différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement (*p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001).

2.5.2. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES TOTAUX

L'application des boues provoque un accroissement significatif des teneurs totales de l'horizon litière en zinc, en cuivre et en cadmium (**Figure 37**). Le maximum du gain est constaté juste après l'épandage pour ces trois éléments. Les coefficients d'enrichissement sont de l'ordre de 7,6 ; 2,6 et 2,8 respectivement pour le Cu, le Zn et le Cd. Ensuite, On observe une diminution progressive du Cu total au cours du temps, tandis que le Zn et le Cd ont tendance à se stabiliser respectivement autour de 80 et 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$ jusqu'au 5^{ème} mois après l'épandage.

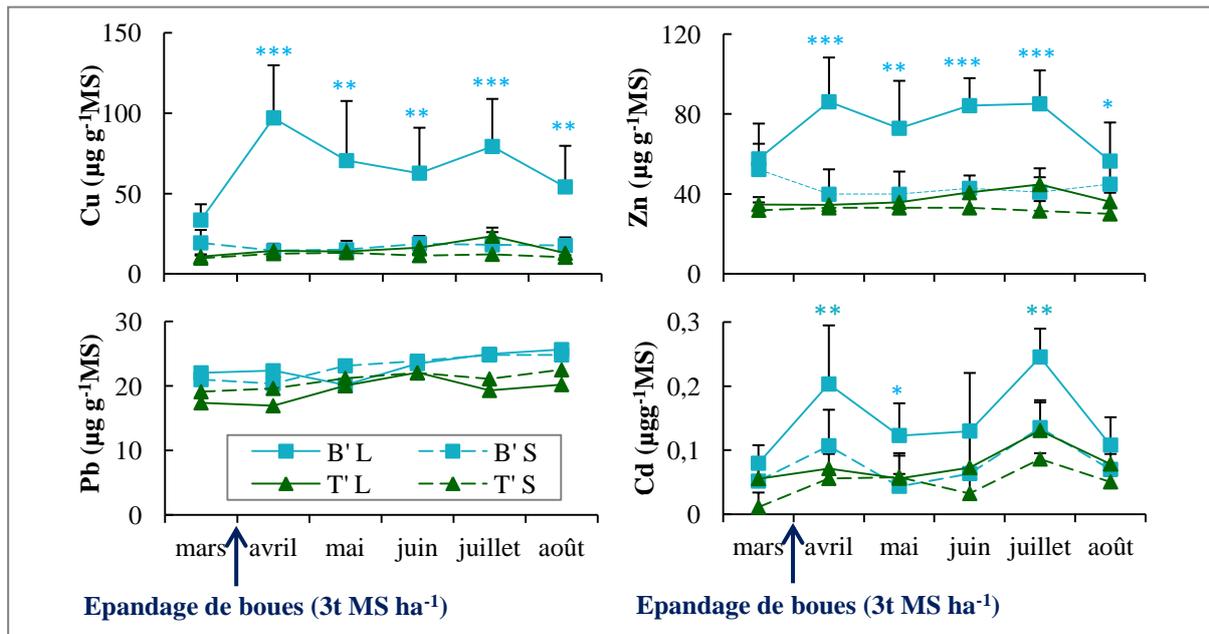


Figure 37 : Variations des teneurs en éléments trace métalliques : Cu et Zn ($\text{mg g}^{-1}\text{MS}$), Pb et Cd ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$) de l'horizon litière (L) et de l'horizon minéral (S) d'un sol forestier (T' : Témoin ; B' : 3 t MS ha⁻¹). Les barres d'erreurs et les astérisques représentent respectivement les écart-types (n=5) et les différences significatives entre les traitements d'un même prélèvement (*p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001).

La comparaison des teneurs moyennes en ces ETM des horizons B'S et T'S ne montre aucun enrichissement significatif. Ainsi, les variations engendrées par les apports de boues ne sont pas significativement différentes des valeurs observées au niveau du témoin. De ce fait, aucune modification de l'horizon S n'est apparue après l'apport des boues et les teneurs en éléments étudiés sont statistiquement stables et identiques à celles des horizons témoins. On note que l'apport des boues n'engendre pas de variation significative des teneurs en Pb quels que soient l'horizon et le mois du prélèvement. Cependant, les valeurs moyennes obtenues sont légèrement supérieures au niveau des placettes amendées. En fin de ce suivi, on note que les concentrations ont tendance à atteindre des valeurs proches des teneurs initiales du sol avant l'épandage.

3. DISCUSSION

3.1. ÉVOLUTION DES CARACTERISTIQUES DU SOL

Barzegar et al. (2002), **Veeresh et al. (2003)** et **Hussein (2009)** ont démontré que les propriétés physico-chimiques des sols ont été modifiées après l'application des boues. Ces modifications sont liées à la composition chimique des boues et surtout à la teneur en matière organique. Dans nos conditions expérimentales, ni le pH, ni le Eh n'ont été modifiés significativement même après un apport de 60 t MS ha⁻¹. Les matières organiques et minérales des boues liquides se concentrent en surface sous forme d'une croûte à pH moins acide (**Tableau 1**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Benbrahim et al. (2003)** sur un podzol à pH acide (4-4,5) et ceux de **Cala et al. (2005)** sur un sol sablo-argilo-limoneux à pH alcalin (8,4). Cependant, d'autres travaux utilisant des boues compostées montrent une augmentation significative du pH du sol qui peut passer de 4,5 à 5,7 (**Benbrahim et al., 2003**).

A partir de 3 mois de culture, le pH des sols amendés a diminué pour atteindre des valeurs plus basses que les valeurs témoins. Cet effet pourrait être attribué aux quantités importantes d'azote minéralisable dans les boues. Ces résultats obtenus sont en accord avec les conclusions des travaux de **Hooda et Alloway (1993)**. **Speir et al. (2003)** démontrent également un effet acidifiant de l'horizon supérieur (0–20 cm) sur un sol sablonneux alcalin. Cette diminution du pH a été plus prononcée après apport des doses élevées de boues. Ce résultat est observé également par **Usman et al. (2004)** et **Hussein (2009)** sur un sol calcaire et ces auteurs suggèrent que cet abaissement de pH est dû aux acides organiques produits lors de la décomposition de la matière organique. **Stamatiadis et al. (1999)** affirment que la réduction du pH du sol est probablement liée au processus de nitrification de NH₄⁺.

Contrairement à l'effet acidifiant souligné par les résultats obtenus au laboratoire, le pH des deux horizons étudiés sur le terrain évolue différemment, ainsi, le pH de la litière augmente significativement après un apport de 3 t MS ha⁻¹. Deux mois après, il rejoint la valeur initiale et se stabilise durant la période du suivi. Cette augmentation temporaire est certainement due à la présence du calcium dans les boues (12,3 mg g⁻¹). Bien que faible, cet apport a permis de corriger le pH pour atteindre des valeurs définies comme optimales (pH 6-7) en agriculture. Ceci favorise l'activité microbienne et assure une meilleure assimilation des nutriments par les plantes (**Singh et Agrawal, 2008**).

La spéciation des métaux, la complexation, l'adsorption et les échanges sur les sites de la phase solide sont intimement liés au pH du sol (**Cavallaro et McBride, 1984 ; Sauvé et al., 1997**). Ainsi, un pH acide favorise la mobilité du métal et pourrait induire des problèmes de phytotoxicité, alors qu'un pH alcalin favorise l'immobilisation de certains éléments (**Toribio et Romanya, 2006**), et dans ce cas, les plantes sont confrontées à des problèmes de nutrition qui ralentiraient leur croissance et perturberaient leur développement.

Lors de cette étude, les valeurs du potentiel redox observées varient légèrement et montrent que le sol est correctement aéré. Toutefois, ces mesures ont été effectuées 1,5 ; 3 ; 6 ; 12 et 18 mois après l'application des boues. Cependant les mesures effectuées juste après l'apport des boues montraient des valeurs très faibles voire négatives. Ce stress hypoxique temporaire est certainement à l'origine de la réduction significative de la croissance des plants

de mélèze observée à un mois et demi de culture (**Chapitre III**). En effet, plusieurs travaux ont souligné la baisse de productivité des plantes qui se développent sur des sols ennoyés (**Kozłowski 1997, Gérard et al 2009**). Le déficit en oxygène du système racinaire inhibe sa croissance. Ces conditions d'hypoxie affecte l'assimilation et la translocation des sucres, le statut hydrique, l'assimilation des éléments minéraux et la biosynthèse de nombreux métabolites dont les régulateurs de croissance, et induit aussi la synthèse de nombreux produits phytotoxiques pour la plante (**Kozłowski, 1984 ; Walsh, 1993**).

3.2. ÉVOLUTION DES TENEURS EN NPK

Le potentiel fertilisant des boues d'épuration a été bien démontré (**Wolstenholme et al., 1992**). Ainsi, leur utilisation présente un intérêt particulier pour les productions de bois intensives (**Mitchell et al., 2000**). Les éléments analysés visent à estimer la valeur agronomique de ces déchets organiques (azote, phosphore et potassium).

3.2.1. L'AZOTE

Les boues de STEP utilisées contiennent 7,2 % d'azote. La décomposition de ces matières riches en azote après leur épandage est extrêmement rapide. Ainsi, les résidus des boues ne renferment plus que 30 % de l'azote contenu dans les boues initiales. Ce résultat est dû probablement à : i) La part plus ou moins importante de l'azote ammoniacale libérée immédiatement (**Impens et Avril, 1992**), ii) la dynamique de l'azote après l'épandage qui montre que les formes d'azote apportées sont très rapidement engagées dans des processus de transformation (**Nicolardot et al., 2003**) (**Figure 37**). **Chaussod et al. (1981)** ont montré que les boues urbaines les plus courantes (boues stabilisées aérobies ou anaérobies), dont la teneur en N Kjeldahl est comprise entre 2 et 5 % et C/N variant de 6 à 12, libèrent 30 à 40 % de leur azote total assez rapidement.

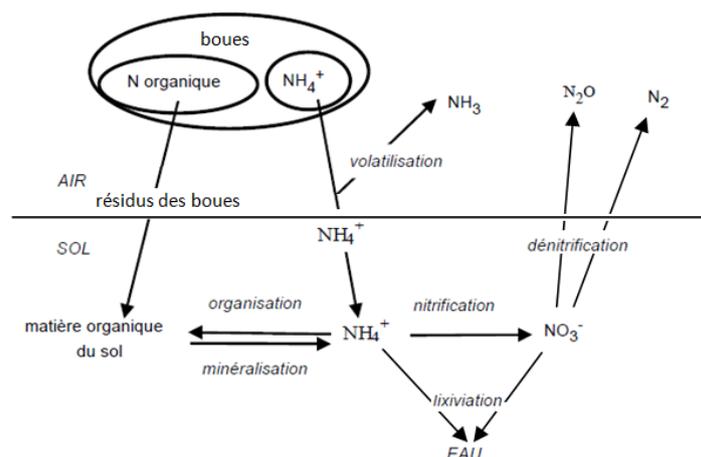


Figure 38 : Principaux processus impliqués dans la transformation des formes d'azote contenues dans les boues d'après **Nicolardot et al. (2003)** (modifiée).

La part de l'azote organique qui n'est pas minéralisée est contenue dans la matière organique apportée par les boues. Celle-ci pénètre dans la couche superficielle du sol, ainsi, le pool d'azote et de carbone organique augmentent proportionnellement à la dose épandue des

boues (**Figure 26 et Tableau 9**) au niveau de l'horizon supérieur. **Benbrahim et al. (2003)** et **Mitchell et al. (2000)** ont montré le même effet après un épandage de boues liquides respectivement dans une plantation de pin maritime (*Pinus maritima*) et de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*). Il s'agit en général d'un enrichissement de l'horizon sous-jacent aux résidus des boues formés en surface. Les teneurs en azote total de cet horizon restent relativement stables quelle que soit la durée de culture. Ceci pourrait s'expliquer par une minéralisation progressive et lente des mottes de boues qui libèreraient une fraction compensant celle assimilée par la plante et/ou entraînée par les eaux de percolation. Les travaux d'**Hernandez et al. (2002)** montrent que la minéralisation de l'azote dans les sols fertilisés par les boues est très dépendante du processus de stabilisation subi à la station d'épuration et les caractéristiques du sol récepteur. Le critère de prédiction le plus utilisé est le rapport carbone organique / azote organique (**Chaussod et al., 1981 ; Nicolardot et al., 2003**). **Bridgham et al. (2001)** et **Duguet (2005)** ont déterminé que la minéralisation de N est positivement corrélée à la matière organique et à la teneur en carbone et en azote, tandis que **Janzen (1987)** et **Sbih (1999)** précisent qu'un fractionnement densimétrique de la matière organique permet d'isoler la fraction légère et confirment que celle-ci contribue fortement à la dynamique du carbone et de l'azote du sol.

Nos résultats montrent que l'apport des boues a réduit le C/N de l'horizon supérieur de 17,6 à 11,3 pour B1 et 9,2 pour B2 après 1,5 mois de culture. Ainsi, seul, l'apport de 60 t MS ha⁻¹ a permis d'amener cet horizon à des valeurs optimales (9 à 10) (**Duchaufour, 1950**). Toutefois, ce pool de matière organique subit une dégradation induite par une stimulation des activités enzymatiques. **Lakhdar et al. (2010)** soulignent que cette amélioration pourrait être associée à un changement de la communauté microbienne. Les éléments solubles libérés sont ensuite absorbés par les racines des plantes et/ou lessivés par les eaux de percolation et/ou de ruissellement. Ainsi, on remarque que le C/N augmente progressivement pour atteindre 12,8 et 11,4 respectivement au niveau de l'horizon supérieur de B1 et B2 après 18 mois de culture. Il faut noter que le rapport C/N traduit la capacité de l'azote à être minéralisé, et celle-ci évolue inversement au C/N (**Duchaufour, 1977**). Pour les boues liquides, la majeure partie du carbone et de l'azote est présente dans la fraction soluble. **Nicolardot et al. (2003)** ont étudié la dynamique de l'azote du sol (organisation/ minéralisation) en conditions d'incubation contrôlée. Ainsi, la cinétique de minéralisation de l'azote contenu dans des boues testées (Boues urbaines digérées, déshydratées chaulées et séchées) montre un potentiel de minéralisation en 3 mois d'incubation entre 20 et 35 %. Cependant, environ 90 % de ce potentiel de minéralisation est produit au bout de 7 jours d'incubation et se stabilise progressivement. Les traitements de stabilisation par compostage diminuent sensiblement la valeur fertilisante des boues, estimée au travers de la fourniture potentielle en azote minéral (**ADEME, 2001**). En effet, le compostage des composés organiques induit une réduction de la proportion de C et de N tenue sous forme soluble (**Gigliotti et al., 2002**). Les composts se caractérisent par de faibles taux de minéralisation due à la forte diminution de la fraction équivalente «cellulose et hémicellulose» liée à la décomposition de ces composés (**Nicolardot et al., 2003**). Toutefois, le C/N n'est pas souvent suffisant pour expliquer la variabilité des comportements et la dynamique de fourniture en azote. **Ambus et al. (2002)** soulignent une différence nette de minéralisation entre un compost et une boue avec un C/N comparable. **Rowell et al. (2001)** confirment que la minéralisation de l'azote est plus le résultat du

catabolisme des protéines que la décomposition de l'ensemble du substrat. Ceci expliquerait l'absence de corrélation entre la minéralisation du carbone et de l'azote. En revanche, **Guivarch (2001)** a démontré une corrélation entre la valeur fertilisante du phosphore et celle de l'azote.

Sous les conditions naturelles de Mélisey (apport de 3 t MS ha⁻¹), l'augmentation de la fraction d'azote minérale au niveau de la litière lors de notre étude (**Figure 33**) montre que le processus de minéralisation est favorisé. Généralement, une augmentation du pH favorise la minéralisation de la matière organique par stimulation de l'activité biologique (**Mechri et al., 1997 ; Mitchell et al., 2000**). Selon **Banerjee et al. (1997)** et **Mechri et al. (1997)**, la biomasse microbienne du sol augmente à court terme après l'application des boues contenant de faibles quantités d'ETM. Cet effet est dû au supplément de carbone disponible apporté qui se révèle comme accélérateur de l'activité microbienne (**Perrin-Ganier et al., 2003**). Lors de cet apport modéré (3 t MS ha⁻¹), les concentrations en nitrates dans l'horizon minéral du sol n'ont montré aucune modification, ce qui écarte le risque de lixiviation vers les strates profondes et potentiellement vers les eaux souterraines. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par **Carbonell et al. (2009)** lors d'un apport de 30, 60 ou 120 t MS ha⁻¹. Contrairement à ce cas de figure, **Mitchell et al. (2000)** ont enregistré une augmentation significative des teneurs en nitrates et en ammonium de l'horizon minéral pendant les trois mois suivant l'apport des boues. Ces auteurs ont constaté également que la fraction de l'azote organique est immobilisée au niveau de la litière. Nos résultats ont montré que l'apport des boues n'affecte pas l'horizon profond. Néanmoins, une diminution significative de C/N a été observée à 3 et à 6 mois de culture lors de l'apport de 60 t MS ha⁻¹ (**Tableau 10**). Ce résultat pourrait être due à une libération des formes d'azote immobilisées en surface contaminant ainsi les horizons profonds. **Mitchell et al. (2000)** avaient associé cette conversion à une minéralisation accrue favorisée par une amélioration des conditions du milieu.

3.2.2. LE PHOSPHORE

D'un point de vue agronomique, l'accroissement de la teneur en phosphore surtout d'ion phosphore dans le sol doit entraîner une meilleure croissance des plantes. Les boues utilisées correspondent à un intrant de 465 et de 930 kg ha⁻¹ de phosphore total respectivement pour les apports 30 t et 60 t. Le sol utilisé contient initialement 700 kg ha⁻¹ dans l'horizon 0-30 cm. La teneur en phosphore total dans les boues utilisées (15,51 mg g⁻¹) est comparable aux teneurs des boues urbaines obtenues quel que soit le type de traitement des eaux usées. La moyenne est de l'ordre de 20 mg g⁻¹ de MS. La solubilité du phosphore décroît avec l'accroissement de la teneur en fer, en aluminium et en calcium des boues (**Morel et al., 2003 ; 2004 ; Vetterlein et al., 1999**). Le phosphore minéral des boues peut être adsorbé sur les oxyhydroxydes de fer et d'aluminium, et / ou lié à des cations comme le calcium **Brossard et al. (1991)**.

L'enrichissement en phosphore de l'horizon supérieur du sol s'est manifesté intensivement 6 mois après l'épandage dans les deux traitements (30 et 60 t MS ha⁻¹). Les moyennes enregistrées sont de l'ordre de 0,7 et 1,2 respectivement pour B1 et B2 contre 0,2 pour le témoin. Ceci suggère une libération du P par les boues. Ainsi, la désagrégation des mottes de boues formées en surface des pots, produisant de fines particules juxtaposées à l'horizon supérieur, s'accompagne d'une augmentation de la teneur en P de cette fraction

sous-jacente. Les travaux de **Brossard *et al.* (1991)** soulignent que l'enrichissement du sol en P est immédiat après l'épandage de 100 t MS ha⁻¹. Le Pt s'accroît de 68 % dans l'horizon 0-20 cm et se stabilise après l'enfouissement des boues à 1,4 mg g⁻¹. Tandis que l'apport de 10 t MS ha⁻¹ n'augmente significativement les teneurs en P qu'après 60 jours avec un gain de 0,1 mg g⁻¹ par rapport au témoin (0,53 mg g⁻¹ MS). **Warman et Termeer (2005a)** rapportent que c'est souvent un processus lent quand il s'agit de sols récemment amendés. Les résidus de boues en surface, en présence de calcium et de fer, présentent un pouvoir fixateur à l'égard des ions phosphates et que 0,96 % du P dans les boues est sous forme organique. (**Brossard *et al.*, 1991**). Un an après l'apport des boues (0, 40, 80 et 120 t MS ha⁻¹), **Martinez *et al.* (2002)** ont observé des teneurs en P élevées au niveau de l'horizon supérieur du sol (0-15 cm). Ces teneurs diminuent progressivement pendant les trois années de suivi. Dans le cas des épandages répétés (quinze apports de 5 et 10 t MS ha⁻¹ an⁻¹), les boues liquides aboutissent à des teneurs importantes en P biodisponible dans l'horizon supérieur (**Mantovi *et al.*, 2006**). Bien que bénéfique pour le végétal, une teneur excessive en P inorganique représente un risque pour l'écosystème car elle pourrait provoquer une eutrophisation des milieux aquatiques (**Karboulewsky *et al.*, 2002**; **Penn et Sims., 2002**). **Wolstenholme *et al.* (1992)** et **Mitchell *et al.* (2000)** ont identifié trois facteurs augmentant le risque de perte de N et de P : i) la période d'épandage (période où le ruissellement de surface survient), ii) le volume important de liquide appliquée et iii) la composition de la phase liquide (influencée par le type de traitement à la station d'épuration). Aucun transfert du P vers l'horizon profond n'a été détecté. **Duguet (2005)** a constaté que la minéralisation de la MO affecte positivement le taux d'immobilisation du P, en effet, la quantité de P libérée est en fonction de l'amplitude de l'immobilisation. **Whalen *et al.* (2001)** a montré que la disponibilité du P stimule l'activité microbienne qui entraîne une immobilisation du P induite par une incorporation du phosphore dans la biomasse microbienne.

Le rapport N/P est l'une des contraintes liées à la réutilisation des boues. Généralement, il est de l'ordre de 2/1, beaucoup plus faible que celui requis par les plantes 5/1 (**Mitchell *et al.* (2000)**). Ainsi, si les taux d'application sont calculés sur la base de la teneur en N total, P sera en excès aux besoins probables des cultures. Les boues épandues lors de cette étude ne présentent pas cette contrainte car le rapport N/P est de 4,6.

3.2.3. LE POTASSIUM

La teneur du sol de Mélisey est très pauvre en potassium (1,6 mg g⁻¹). Toutefois, les apports de potassium par les boues de stations d'épuration sont négligeables (**Figures 27 et 33b**). Les boues liquides contiennent des quantités relativement faibles de K (en moyenne 1 %). Le potassium est très soluble, ainsi une grande quantité se perd avec l'effluent dans le milieu récepteur. Malgré les faibles teneurs, le potassium est facilement assimilable par les plantes (**Sabey et Hart, 1975 ; Pérez Garcia *et al.*, 1986**). **Warman et Termeer (2005a)** souligne que l'application des boues ne fournit pas suffisamment de K pour répondre aux exigences des cultures. De ce fait, il pense qu'une fertilisation chimique assurant les besoins en potasse est nécessaire dans le cas de la réutilisation de ces boues en agriculture.

3.3. ÉVOLUTION DES TENEURS EN ELEMENTS MINERAUX

Les mesures effectuées pour évaluer les concentrations des autres éléments minéraux dans le sol ont permis de constater que les boues liquides n'ont pas modifié significativement les teneurs du sol. Cependant, l'application de 30 t de MS ha⁻¹ de boues a apporté respectivement l'équivalent de 6 ; 42 ; 111 et 369 kg ha⁻¹ de Mn, de Na, de Mg, et de Ca. Ainsi, les boues peuvent contribuer à réduire les déficiences des sols forestiers en ces éléments. **Simard et al. (1998)** ont souligné que le rapport Ca/Mg doit être égal au minimum à 6/1. D'après **Fulton et Meyer (2010)**, la croissance des plantes n'est pas affectée dans la gamme 6/1 à 1/1. Les carences en Mg sont susceptibles de se produire si ce rapport dépasse 8/1. Lorsque la concentration du Mg est supérieure au double de celle du Ca, la croissance des plantes est défavorisée. Ainsi, l'ajout de la chaux est obligatoire afin d'équilibrer les besoins nutritionnels des plantes. Les boues utilisées lors de cette étude avaient un rapport Ca/Mg d'environ 3/1. **Warman et Termeer (2005b)** ont montré que les teneurs du sol en cations échangeables (Ca, Mg, Mn et Fe) augmentent significativement dans les 20 cm de profondeur. **Korboulewsky et al. (2001)** indiquent que les teneurs extractibles en Ca et Mg semblent augmenter mais seule l'apport de 90 t ha⁻¹ engendre une différence significative. Ces apports accroissent la disponibilité de ces éléments pour les cultures, ce qui est bénéfique pour les sols carencés. **Imai et al. (2010)** ont démontré que les boues compostées conduisent à une augmentation des teneurs du sol en éléments minéraux excepté le Fe. Ils avaient également constaté que les formes biodisponibles augmentent proportionnellement aux teneurs totales sauf pour Mg et Ca. Ainsi, ils ont observé que ces éléments minéraux sont perdus par lessivage.

3.4. ÉVOLUTION DES TENEURS EN ELEMENTS TRACES METALLIQUES

La réglementation de l'épandage des boues impose des teneurs limites en métaux traces pour les sols et les boues (**Tableau 2**) avec un apport cumulé sur 10 ans de 30 t MS ha⁻¹. Ces teneurs et flux limites réglementaires ont été définis par l'arrêté de janvier 1998 dans un souci de ne pas modifier de façon durable et irréversible les concentrations en métaux des sols.

Les ETM sont omniprésents dans les boues urbaines. Leur concentration dépend de plusieurs facteurs tels que: l'origine, les procédés de traitement et le type de réseaux de collecte des eaux usées (**Roy et Couillard, 1997**). La solubilité de ces métaux dans la solution du sol est influencée par les propriétés physico-chimiques du sol tels que le pH, le potentiel redox (Eh), le contenu en matières organiques et en argile, ainsi que la dose et le type des boues appliquée (**Hue et Ranjith, 1994 ; Richards et al., 2000 ; Singh et Agrawal, 2008**). Elle est régie par les processus physiques et chimiques, illustrés dans la **Figure 38**, tels que l'adsorption, la précipitation et la formation de complexes (**Roy et Couillard, 1997**). **Camargo et al. (2007)** rapportent que le Cu et le Cd sont prédominant dans la fraction échangeable tandis que le Pb et le Cu reste piégés dans les oxydes de Fe ou de Mn et dans la fraction organique du sol. La dilution isotopique a montré qu'en moyenne 61 % du Cd était échangeable contre 33 % pour le Zn, ainsi, le Cd est celui qui migre le plus facilement dans le sol, et est surtout localisé dans la phase échangeable (**Legret et al., 1988 ; Prasad et Hagemeyer, 1999**). Par ailleurs, **Hyun et al. (1998)** ont obtenu une relation linéaire entre le carbone organique et la fraction mobile du Cd dans une solution du sol fertilisé par les boues

de station d'épuration. La majorité du Cd soluble reste complexée au carbone organique soluble.

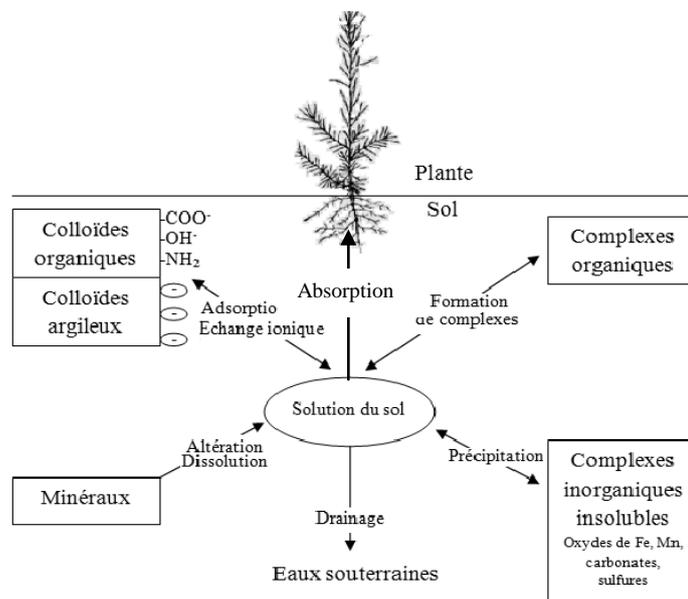


Figure 39 : Evolution des ETM dans les sols amendés par les boues (d'après Roy et Couillard, 1997) (modifiée).

Les boues ont enrichis l'horizon supérieur en Cu et Zn en fonction de la quantité de boues épandues, et également en Cd même si les différences ne sont pas significatives. **Cala et al. (2005)** ont signalé que les concentrations du Cu, Pb et Zn ont augmenté significativement dans un mélange « sol-boues » après l'apport de 20 et 40 t MS ha⁻¹ et que les valeurs étaient encore inférieures à celles considérées comme phytotoxiques. Les teneurs normales du sol, sans effet de phytotoxicité, se situent entre 10 et 80 µg g⁻¹ pour le Cu, 10 et 300 µg g⁻¹ pour le Zn et 0,5 et 3 µg g⁻¹ pour le Cd (**Prasad et Hagemeyer, 1999**). D'autres auteurs (**Baize et al., 2006 ; Jalali et Khanlari, 2006**) rapportent que l'horizon de surface d'un sol amendé montrait toujours une contamination importante en Cd, Zn, Cu et Pb. Ils ont suggéré que ces éléments ont été immobilisés sous des formes chimiques stables dont les transferts sont négligeables. Après apport des boues, **Horswell et al. (2006)** ont souligné que les ETM se répartissent uniformément à la surface du sol forestier et restent concentrés dans la litière. Ils avaient conclu que la faune du sol et surtout de la litière pourrait s'exposer à des teneurs considérables d'ETM. Ainsi, des apports réguliers de boues peuvent conduire à une accumulation des éléments métalliques dans les sols récepteurs. **Benbrahim et al. (2003)** émettent l'hypothèse, qui semble également s'appliquer à notre étude, que la matière organique des boues retient ces éléments en surface du sol et supposent que des mesures complémentaires (matière colloïdale, mobilité de l'élément selon le pH, matière organique...) peuvent apporter les éclaircissements nécessaires pour mieux comprendre cette immobilisation.

La fraction échangeable ou adsorbée demeure très faible (<10 %) pour ces ETM, tandis que les formes réfractaires, liées à la matière organique et aux carbonates et les formes résiduelles sont plus abondantes (**Roy et Couillard, 1997**). Tant que les conditions du milieu ne changent pas, le Cu est fortement lié à la matière organique du sol (**Roy et Couillard,**

1997 ; Kim et McBride, 2006). L'évolution des teneurs en Cu total observée lors de cette étude influence la fraction échangeable. Par ailleurs, celle-ci est proportionnelle à la dose des boues appliquée. Doroshkevich et Badmaev (2008) ont montré que l'apport des doses croissantes de boues provoque une augmentation proportionnelle de la concentration de formes mobiles des microéléments et des ETM dans l'horizon supérieure (0-20 cm) d'un sol limoneux. Cette accumulation est maximale lorsqu'on apporte l'équivalent de 60 t ha⁻¹. Des résultats similaires concernant le Cu et le Zn ont été observés par Cala *et al.* (2005).

L'enrichissement significatif de l'horizon inférieur observé après 6 mois de culture témoigne d'un potentiel migratoire du Cu qui pourrait s'expliquer par une solubilisation accrue. Généralement, une minéralisation progressive des boues peut induire des phénomènes de remobilisation des ETM qui risquent de poser plus tard des problèmes de phytotoxicité, de contamination des producteurs primaires ou des eaux de surface ou souterraine. *In situ*, On a constaté une diminution progressive du Cu total au cours du temps, ce qui constitue la preuve d'une évolution des formes immobilisées en formes solubles absorbées par les plantes (Chapitre III) et/ou entraînées par la solution du sol vers les horizons profonds du sol et également vers la nappe (Chapitre II).

Le Zn biodisponible est la fraction qui augmente fortement lorsque les boues d'épuration sont appliqué au sol acide (Planquart *et al.*, 1999). Bhogal *et al.* (2003) et Moffett *et al.* (2003) ont montré que le Zn est moins lié à la matière organique contrairement aux autres ETM et par conséquent serait moins affecté par la décomposition de la boue. Alors, ils ont conclu que c'est un élément facilement lessivable et qu'en plus de son impact sur la biodisponibilité des autres métaux, il influence l'activité microbienne, la nitrification et la décomposition de la MO même à des faibles quantités. Malgré le pH acide du sol utilisé (4,7), nos résultats ne montrent aucune mobilité du Cu, ni du Zn vers l'horizon profond, alors que Singh et Agrawal (2008) précisent que la mobilité de ces éléments dans un sol augmente respectivement si le pH est inférieur à 4,5.

Le Pb est présent naturellement dans l'environnement mais peut aussi provenir des activités anthropiques (peintures, essence, tuyauterie...). Le niveau naturel du Pb dans le sol est inférieur à 50 µg g⁻¹ MS. Le plomb libéré peut contaminer l'air, le sol et l'eau et s'y accumuler au fil du temps (Ona *et al.* 2006). Ce qui présente un danger pour la santé humaine. En conditions contrôlées ou en laboratoire, l'addition des différentes doses de boues n'a causé aucun effet sur les teneurs en Pb du sol par rapport au témoin. La quantité du plomb apportée par les boues est minime compte tenu de la teneur initiale présente dans le sol de Mélisey (13 µg g⁻¹). En effet, les apports de boues 3, 30 et 60 t MS ha⁻¹ ne représentent que 0,1 ; 1 et 2 % respectivement du stock initial du sol. La complexation avec les colloïdes organiques et inorganiques du sol, l'adsorption sur les argiles et la précipitation par les carbonates et les oxydes de métaux et de minéraux réduisent la solubilité et la biodisponibilité du Pb (Ruby *et al.*, 1999). Cependant, d'autres auteurs (Ramos *et al.*, 1994 ; Kim et McBride, 2006) suggèrent que le Pb soit associé principalement aux oxydes.

Le Cd est l'un des ETM potentiellement toxiques les plus redoutés malgré sa faible abondance dans les sols. Car il est toxique à faible concentration, très mobile en milieu acide et fortement biodisponible. Dousset *et al.* (1999) soulignent que c'est la forme sous laquelle le métal est apporté au sol qui est déterminante. Les engrais phosphatés sont reconnus comme une source non négligeable de Cd. Lee et Keeney (1975) estiment qu'il faut 186 ans

d'application d'engrais phosphatés pour égaler un apport de 9 t MS ha⁻¹ de boues urbaines. Ainsi, l'épandage de celles-ci contribue fortement à l'accumulation significative du Cd dans les sols. **Baize et al. (2006)** ont conclu que l'impact de l'épandage des boues est très net pour les teneurs totales en Cd des sols agricoles. Celles-ci sont passées de 0,07 µg g⁻¹ en 1997 à 0,28 µg g⁻¹ en 2003. Contrairement aux résultats de **Lee et Keeney (1975)**, **Baize et al. (2006)** avaient constaté qu'une fertilisation minérale classique a le même effet sur la teneur en Cd.

4. CONCLUSION

Les effets à court terme étudiés dans cette expérimentation ont montré que l'apport de boues liquides a eu un effet sur les qualités fertilisantes du sol. En effet, on observe particulièrement un enrichissement important en azote et en phosphore de l'horizon superficiel qui est en contact avec les agrégats des boues. Cet enrichissement se maintient jusqu'à la fin de l'expérimentation (18 mois après l'apport des boues). Ceci devrait augmenter le recyclage de ces éléments dans le système sol-plante du fait de la capacité des racines à venir puiser les éléments nutritifs directement dans cet horizon. Ainsi, selon la dose épandue, les boues peuvent couvrir, en partie ou en totalité, les exigences des cultures en azote et en phosphore. Le mélèze est une essence à croissance rapide qui se prête bien à la culture intensive. Les besoins en N et en P sont alors très élevés surtout en début de plantation. Ainsi, les apports de boues pourraient être bénéfiques. Cependant, la quantité apportée doit être calculée à partir des stocks initiaux du sol pour atteindre un niveau de fertilité moyenne proposé par **Bonneau (1995)**, tout en assurant un équilibre entre les différents éléments pour éviter tout risque de déséquilibre nutritionnel ou de toxicité (apport raisonné).

Les teneurs totales en Cu et en Zn du sol de surface augmentent significativement. Cette augmentation est proportionnelle à la dose de boues apportée. Toutefois, aucun effet sur les horizons profonds n'a été observé. L'apport de boues n'a pas amélioré les teneurs du sol en éléments minéraux. Ce résultat attendu est lié vraisemblablement aux teneurs trop faibles présentes dans les boues épandues. Les éléments traces métalliques contenus dans les boues ont été retenus dans la matière organique limitant leur lixiviation. Ce phénomène de fixation aux particules solides et donc d'accumulation dans les sols est prépondérant, ainsi, le sol joue un rôle de stockage des éléments en traces. Toutefois, des processus de remobilisation sont possibles (mise en solution par des phénomènes d'oxydoréduction, changements des conditions du sol,...). En réponse à ces modifications, la disponibilité des éléments traces est alors accrue (mobilité et biodisponibilité) et des transferts vers les eaux (**Chapitre II**), les plantes (**Chapitre III**) ou la chaîne trophique (**Chapitre IV**) peuvent se produire.

Chapitre II

**Épandage de boues de station d'épuration en
parcelles boisées :**

Quels impacts sur les ressources hydriques?

Plusieurs systèmes aqueux sont concernés par le devenir des éléments contenus dans les boues : la solution du sol elle-même, les eaux des nappes souterraines et les eaux de surface. Leur concentration en éléments toxiques est doublement intéressante parce que les substances dissoutes sont biodisponibles et susceptibles de migrer vers toutes les composantes de l'écosystème. Ce chapitre vise à mettre en lumière l'impact des épandages de boues sur la composition chimique des différents compartiments hydriques, à savoir l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur, la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur et l'eau d'une source superficielle située à 50 m de la parcelle d'étude.

1. COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFERENTS COMPARTIMENTS HYDRIQUES:

1.1. L'AZOTE MINERAL

La **Figure 40** montre les variations des différentes formes d'azote minéral dans la solution du sol. Un mois après l'apport des boues, on observe pour les SP amendées (B') une augmentation significative de la teneur des nitrates dans la solution du sol. Ainsi, lors de ce premier prélèvement effectué en avril, la quantité des NO_3^- lessivée à 20 cm est trois fois plus importante (6 mg L^{-1}) que dans le cas du témoin (2 mg L^{-1}). Bien que la teneur en nitrate de la solution du sol (B'40) se rapproche de la valeur enregistrée par (B'20), la différence n'est pas significative avec le témoin (T'40). Par la suite, ces deux valeurs diminuent et se stabilisent à partir du troisième mois autour d'une valeur moyenne de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ enregistrée également dans les SP témoins (T') au niveau des deux profondeurs. Durant toute la période de suivi, les NO_2^- et le NH_4^+ ne montrent pas de différence entre les traitements (B') et (T') quelle que soit la profondeur du prélèvement de la solution du sol.

L'analyse de l'eau de la nappe ne montre aucune variation temporelle (**Figure 41**). Durant les cinq mois de suivi, aucune différence significative n'a été notée entre les deux traitements. De plus, les concentrations retrouvées dans l'eau de la source ne sont pas différentes de celles obtenues dans l'eau de la nappe. Néanmoins, on note que les NO_3^- dans l'eau de la source sont trois fois plus importantes en juillet et en août par rapport à l'eau de la nappe.

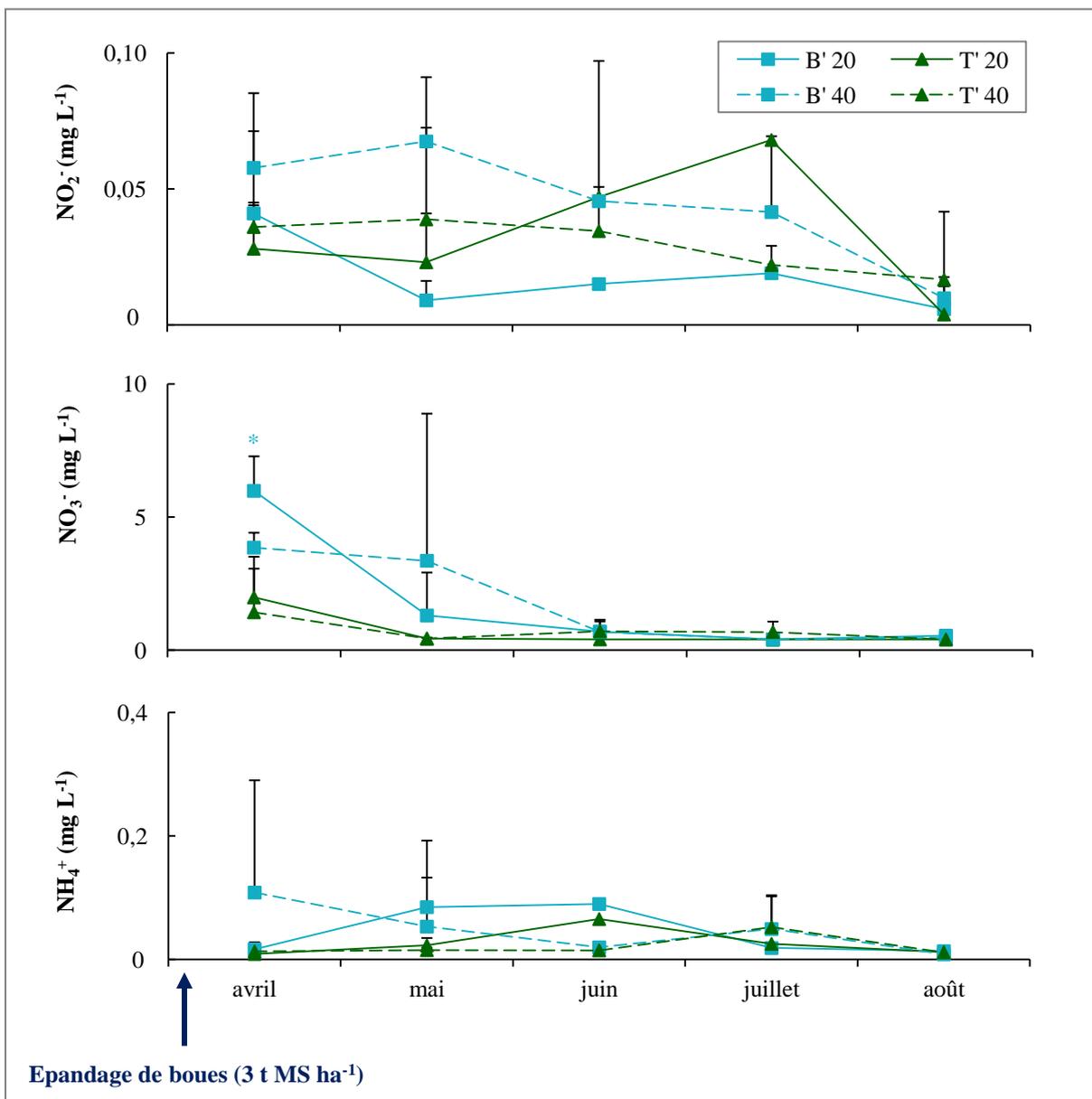


Figure 40 : Variations de la teneur en diverses formes d'azote minéral de la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur et les astérisques représentent respectivement les écarts-types (n=5) et les différences significatives entre le traitement B' et le témoin T' (*p<0,05).

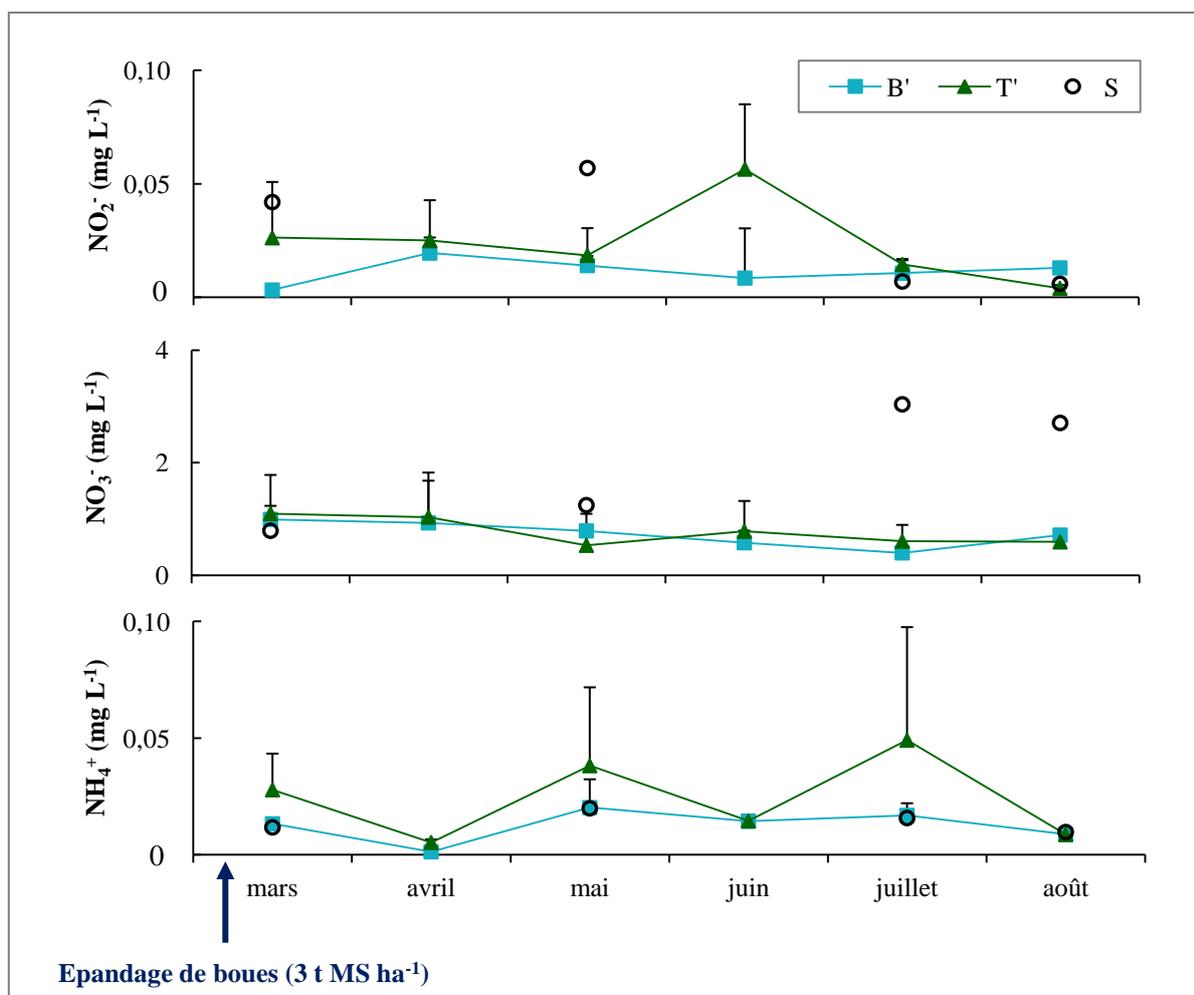


Figure 41 : Variations de la teneur en diverses formes d'azote minéral de l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3). Les cercles noirs indiquent les valeurs mesurées dans l'eau de la source (S) située en bas de pente.

1.2. LE PHOSPHORE ET LE POTASSIUM

Dans la très grande majorité des échantillons analysés, les concentrations de P sont inférieures à la limite de détection de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$. Pour le K, aucune différence significative n'a été observée entre les concentrations mesurées chez les deux traitements (B') et (T') ni dans la solution du sol, ni dans l'eau de la nappe (**Figures 42 et 43**). Les teneurs retrouvées dans la solution du sol prélevée à 20 cm de profondeur sont trois fois plus importantes que celles enregistrées à 40 cm. Quant à l'eau de la nappe, les valeurs restent inférieures à 1 mg L^{-1} . Il est à noter que les valeurs moyennes calculées restent stables au cours des cinq mois de suivi et ceux pour les deux traitements. Les teneurs en K mesurées dans l'eau de la source sont également stables et légèrement supérieures à celles mesurées dans la nappe.

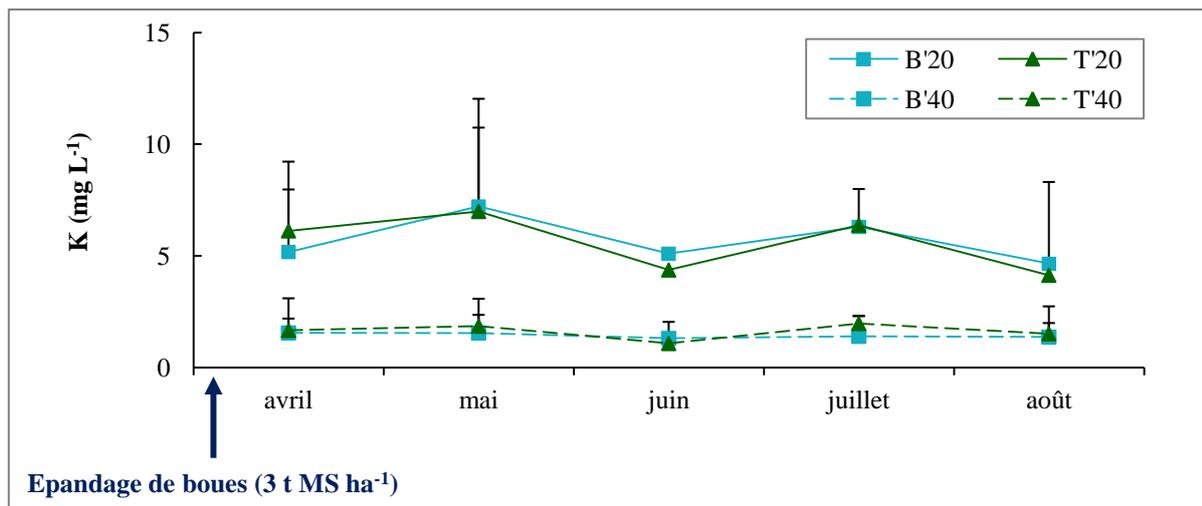


Figure 42 : Variations de la teneur en potassium de la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5).

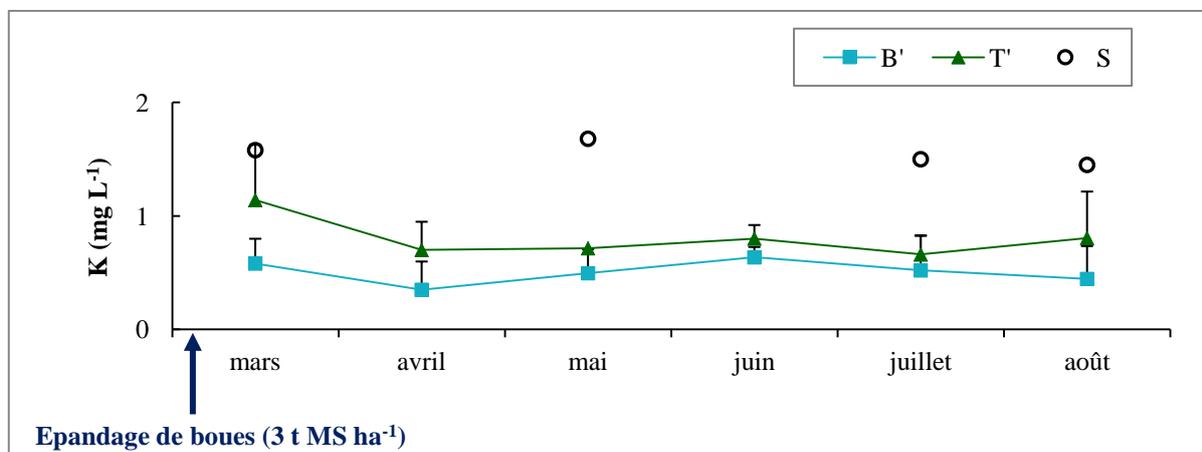


Figure 43 : Variations de la teneur en potassium de l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3). Les cercles noirs indiquent les valeurs mesurées dans l'eau de la source (S) située en bas de pente

1.3. LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX

Les concentrations en éléments minéraux (Mg, Ca et Mn) mesurées dans la solution de sol prélevée dans les deux profondeurs sont similaires. Ainsi, les concentrations fluctuent peu autour d'une valeur moyenne presque stable pendant toute la durée du suivi. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements (B') et (T') (**Figure 44**). Le cas du Na est particulier puisque les valeurs enregistrées dans les solutions du sol prélevées dans les SP (B') tendent à être plus élevées par rapport à (T') et ce quelle que soit la profondeur. Toutefois, les concentrations moyennes sont plus élevées en surface (20 cm) qu'en profondeur (40 cm). Dans le cas de l'eau de la nappe, les concentrations des 4 éléments minéraux sont similaires entre les deux traitements (T' et B') (**Figure 45**) et les variations temporelles sont trop faibles au cours du suivi. Les teneurs de l'eau de la source en Mg, Ca et Mn sont proches de 0, tandis que les concentrations de Na est deux fois plus importante comparées à l'eau de la nappe.

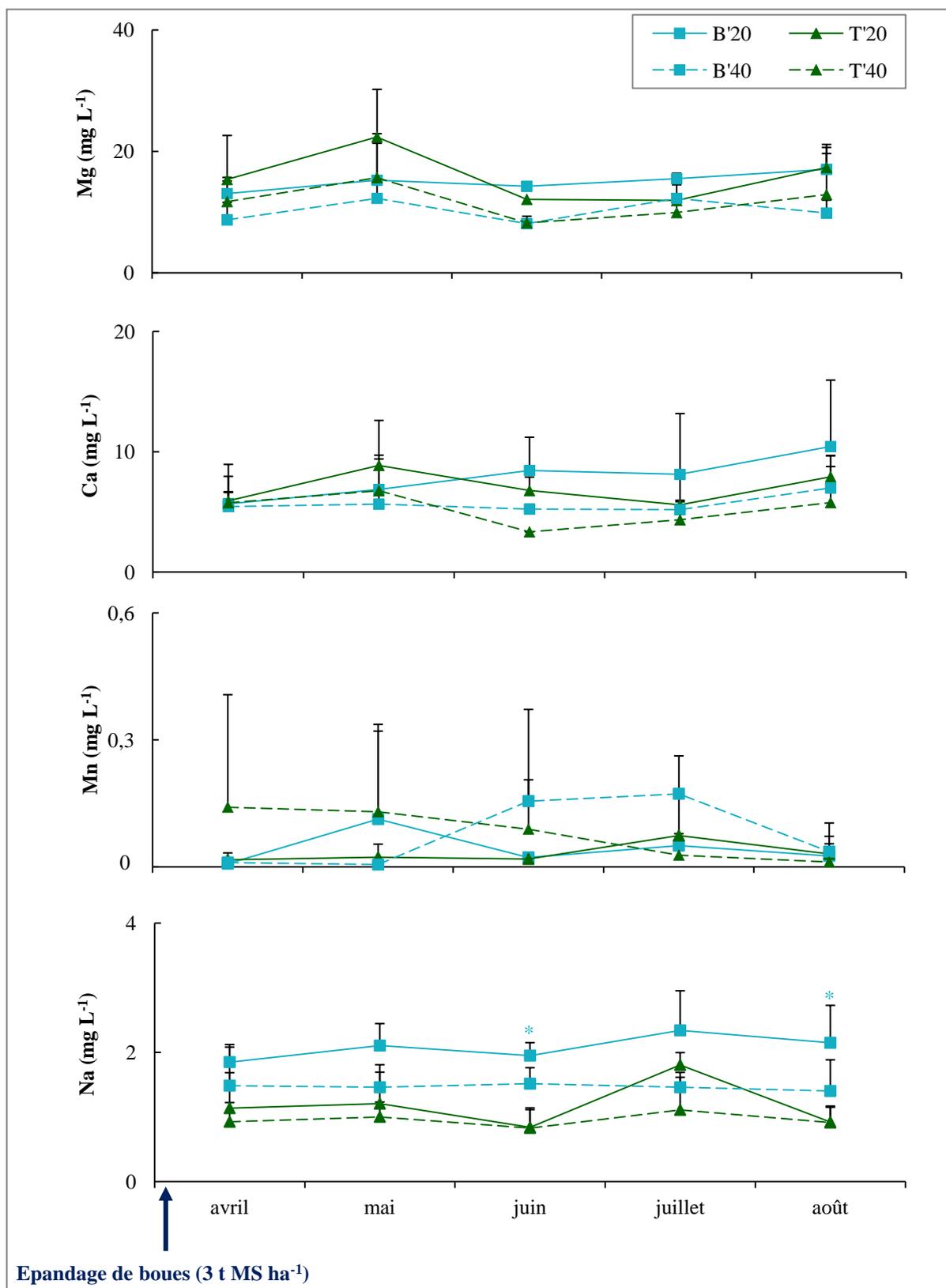


Figure 44 : Variations de la teneur en éléments minéraux (Mg, Ca, Mn et Na) de la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur et les astérisques représentent respectivement les écarts-types (n=5) et les différences significatives entre le traitement B' et le témoin T' (*p<0,05).

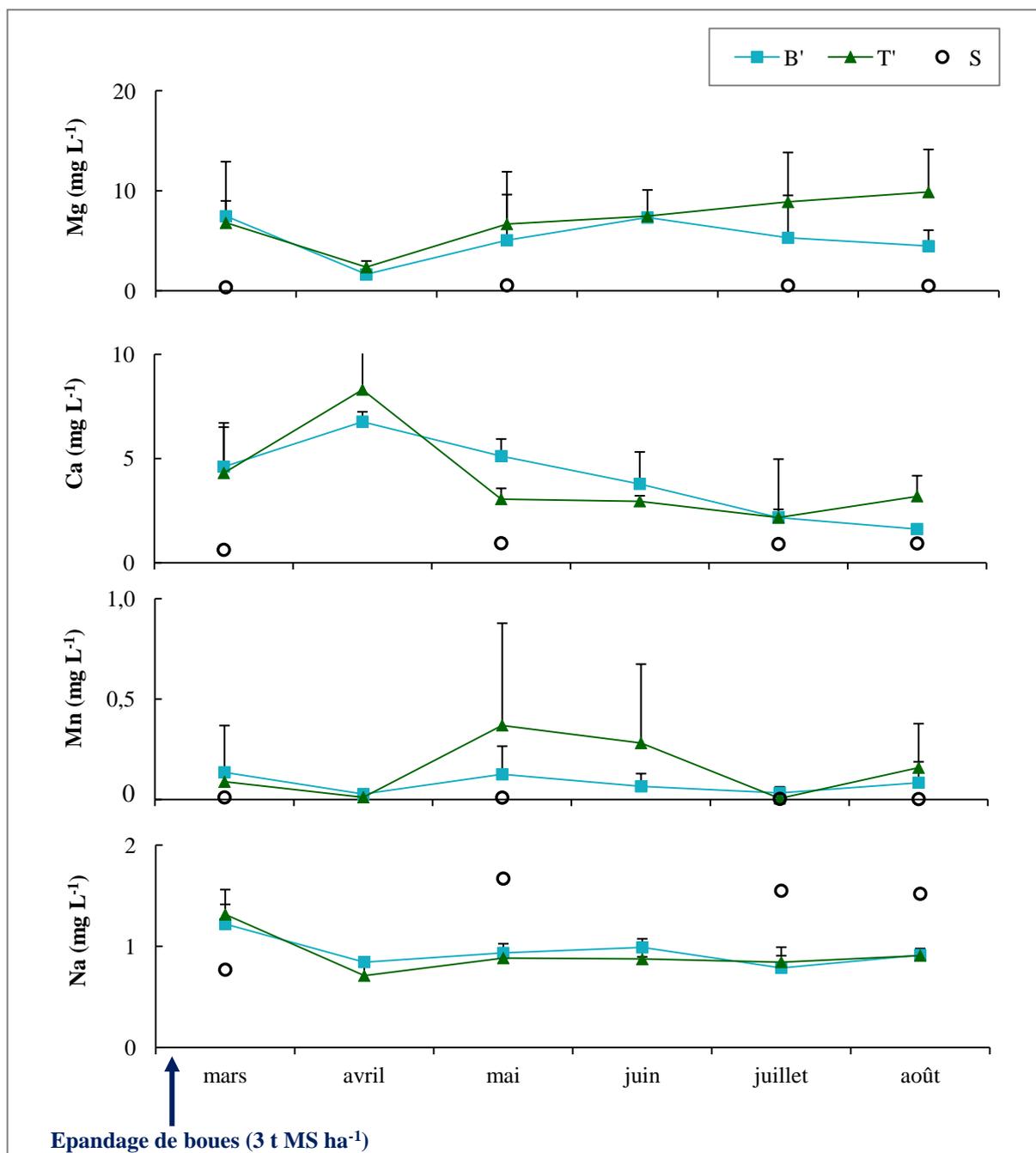


Figure 45 : Variations de la teneur en éléments minéraux (Mg, Ca, Mn et Na) de l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3). Les cercles noirs indiquent les valeurs mesurées dans l'eau de la source (S) située en bas de pente.

1.4. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

Comme pour les éléments minéraux, les concentrations des 4 ETM (Zn, Cu, Pb et Cd) ne présentent aucune différence significative entre les deux traitements (B') et (T') et ce à la fois pour la solution du sol (**Figure 46**) et l'eau de la nappe et de la source (**Figure 47**). On note également que les teneurs mesurées dans la solution du sol sont similaires entre les deux niveaux de prélèvement (20 et 40 cm). Excepté le Cu, l'eau de la source montre une composition très similaire avec celle de l'eau de la nappe. Dans le cas du Cu, les concentrations se sont révélées inférieures aux limites de détection de l'ICP-MS (2 µg L⁻¹ MS).

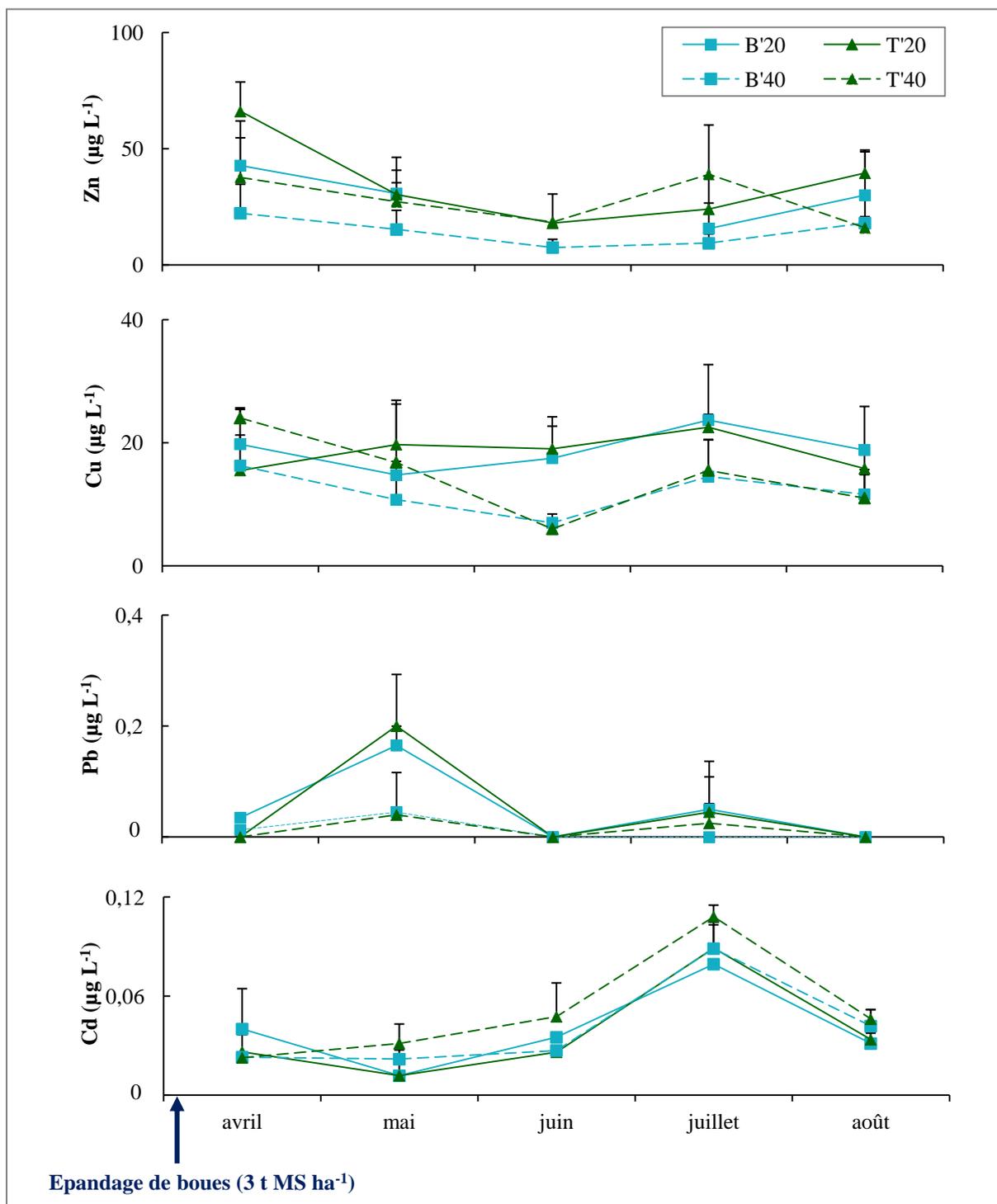


Figure 46 : Variations de la teneur en éléments traces métalliques (Zn, Cu, Pb et Cd) de la solution du sol prélevée à 20 et à 40 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5).

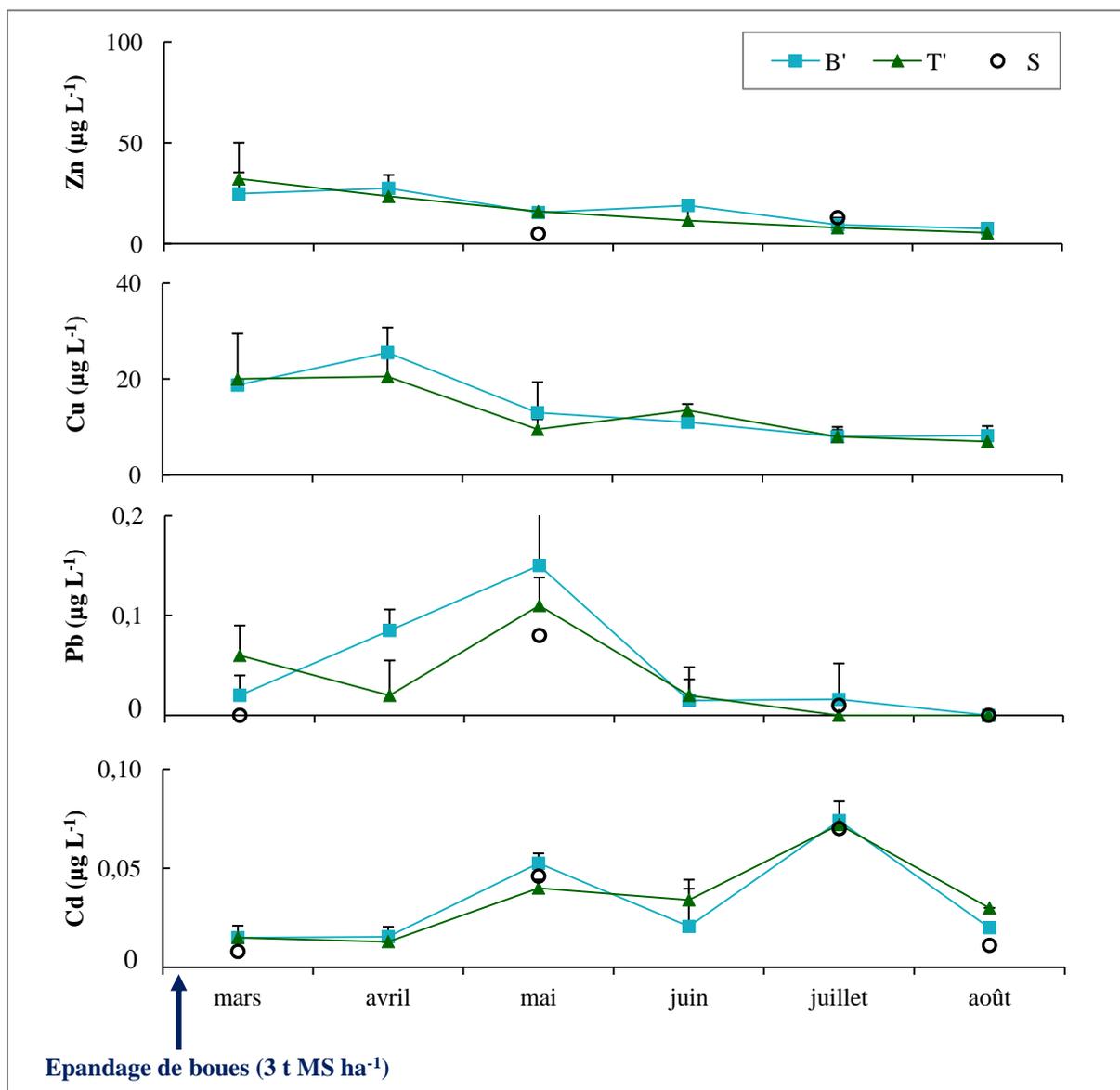


Figure 47 : Variations de la teneur en ETM (Zn, Cu, Pb et Cd) de l'eau de la nappe prélevée à 80 cm de profondeur dans les SP amendées (B' : 3 t MS) et témoins (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3). Les cercles noirs indiquent les valeurs mesurées dans l'eau de la source (S) située en bas de pente.

2. ECOTOXICITE DES LIXIVIATS

Comme il a été signalé dans la partie « matériels et méthodes », les bio-essais vis-à-vis de *Lemna minor* ont été effectués en parallèle sur les lixiviats bruts et avec ajustement de pH. Pour chaque essai, des courbes de toxicité « concentrations-effets » sont modélisées. La modélisation des données de toxicité est effectuée à partir du programme Regtox version 6.6.2 (macro pour Microsoft Excel) développé par **Vindimian et al. (1983)**. Les réponses des lentilles d'eau exposées aux lixiviats sont présentées par l'intermédiaire de la CE20. La CE20 est la Concentration Efficace qui provoque 20 % d'effet sur la population testée par rapport au témoin. Dans notre cas, on observe une stimulation de la croissance (inhibition négative) qui résulte de la disponibilité de nutriments minéraux apportés par les boues de STEP et véhiculés par les lixiviats.

2.1. IMPACTS DES LIXIVIATS SUR LES LENTILLES D'EAU

2.1.1. SANS AJUSTEMENT DE pH

Seuls les lixiviats obtenus après l'apport de l'équivalent de 60 t MS ha⁻¹ ont induit une forte stimulation (Tukey, $p < 0,001$) de la croissance des lentilles d'eau en comparaison de celle des témoins (**Figures 48 et 49a**) (l'eau épurée est présentée à titre indicatif). Cette stimulation de croissance est de 243 %. La quantité de boues correspondante à CE20 est de l'ordre de 34 t MS ha⁻¹. Excepté les lixiviats obtenus après l'apport de l'équivalent de 60 t MS ha⁻¹ dont le pH était supérieur à 6, il convient de noter que la valeur moyenne du pH des autres lixiviats est de 5,5 (**Tableau 16**).

Tableau 16 : pH des lixiviats avant le lancement du bio-essai (n=5) :

Lixiviats	0	0,4	3	10	30	60
pH	5,6 ± 0,08 ^b	5,8 ± 0,08 ^c	5,3 ± 0,05 ^a	5,2 ± 0,03 ^a	5,6 ± 0,05 ^b	6,1 ± 0,08 ^d

2.1.2. APRES AJUSTEMENT DE pH

Les lentilles d'eau présentent une croissance optimale lorsque le pH est compris entre 6,5 et 8,5 (**ISO 20079:2005(F)**). Ainsi, le pH des lixiviats a été ajusté à 6,5. Les résultats présentés dans la **Figure 49b** montrent que la CE20 a fortement baissée et a atteint 9 t MS ha⁻¹ comparée à l'essai précédent (sans ajustement du pH). D'après la courbe de l'effet calculé, la stimulation devient maximale (153 % par rapport aux témoins) et se stabilise dès l'apport de l'équivalent de 13 t MS ha⁻¹.

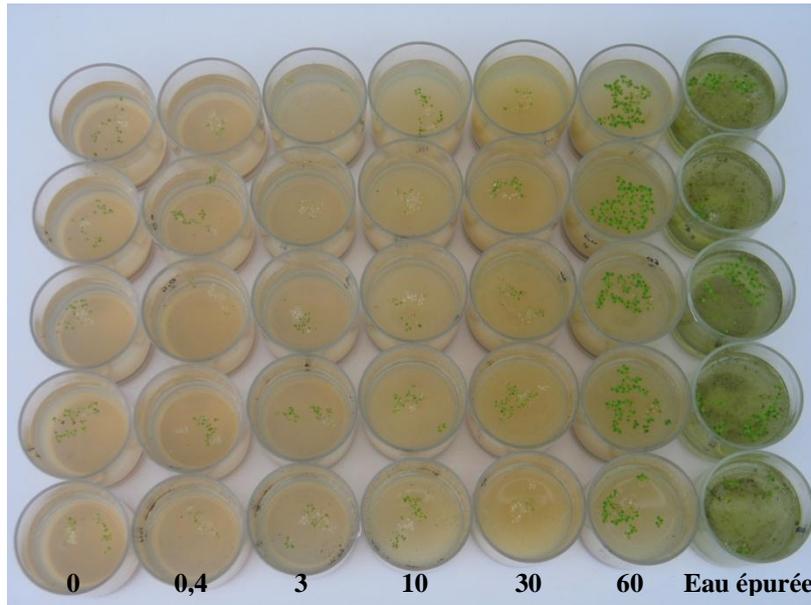


Figure 48 : Essai *Lemna minor* à J+7. De gauche à droite : lixiviats obtenus par l'apport de l'équivalent de 0, 0,4, 3, 10, 30 et 60 t MS ha⁻¹ de boues de STEP.

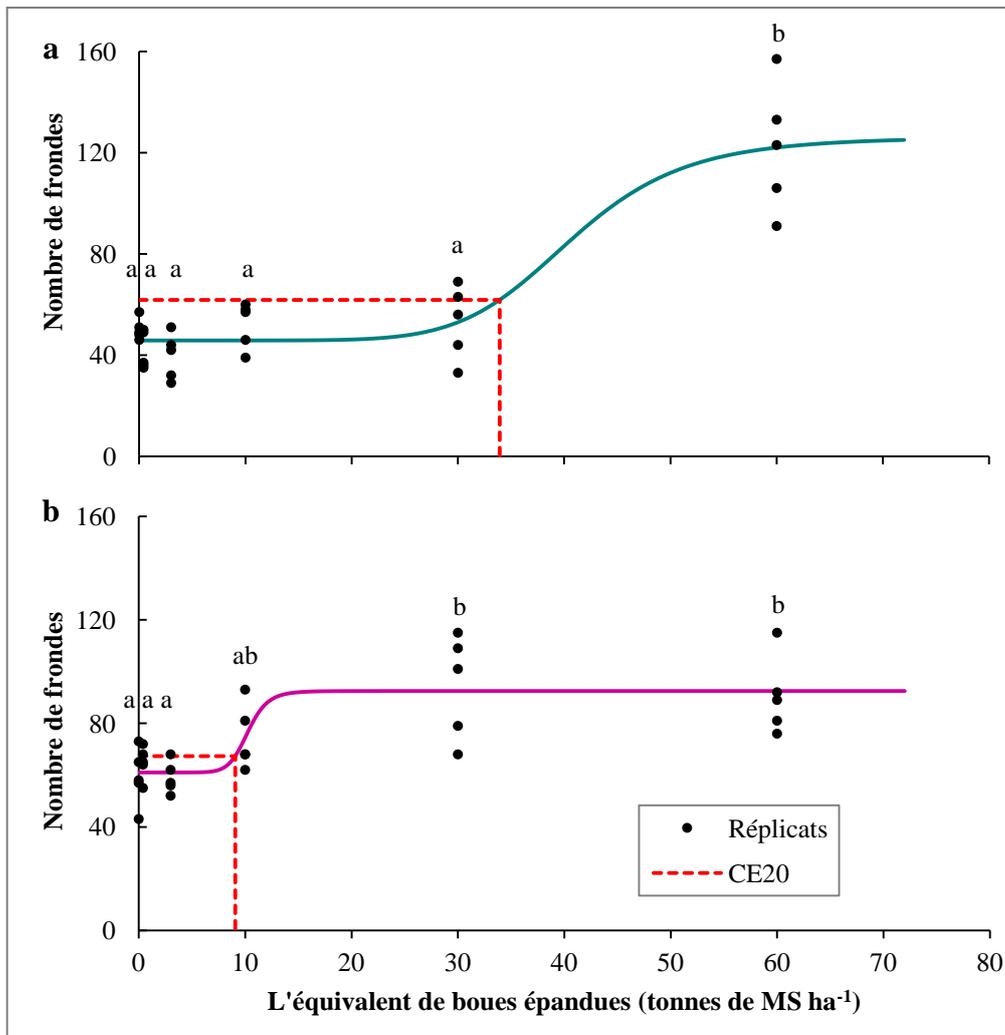


Figure 49 : Courbe concentrations-réponses de l'essai d'inhibition de la croissance de *Lemna minor* (nombre de frondes) en 7 jours, sur les lixiviats (a) sans et (b) après ajustement de pH. Les lettres indiquent les différences significatives entre les différents traitements.

La **Figure 50a** montre le % de stimulation de la croissance par les lixiviats. On remarque que les lixiviats bruts, sans ajustement de pH, stimulent la croissance uniquement après l'apport de 60 t MS ha⁻¹ de boues, tandis que les apports inférieurs à l'équivalent de 25 t MS ha⁻¹ montrent une inhibition de l'ordre de 0 à 10 %. Par contre, les lixiviats à pH ajusté agissent selon une relation dose-réponse avec un plateau de la réponse obtenu à partir de 30 t MS ha⁻¹ de boues. Les effets obtenus lors d'un apport de boues inférieur ou égal à 10 t MS ha⁻¹ ne sont pas significativement différents du témoin.

Lors de l'inhibition de croissance par les lixiviats bruts, nous avons constaté un phénomène de toxicité se traduisant par un blanchissement des frondes des lentilles. Ainsi, environ 40 % des frondes ont perdu leur chlorophylle (**Figure 50b**). Cet effet toxique a été levé en ajustant le pH jusqu'au seuil minimal de la gamme optimale de croissance des lentilles d'eau (6,5-8,5) (**ISO 20079:2005(F)**). Toutefois, les différents traitements présentent un taux similaire de frondes blanches (environ 5 %).

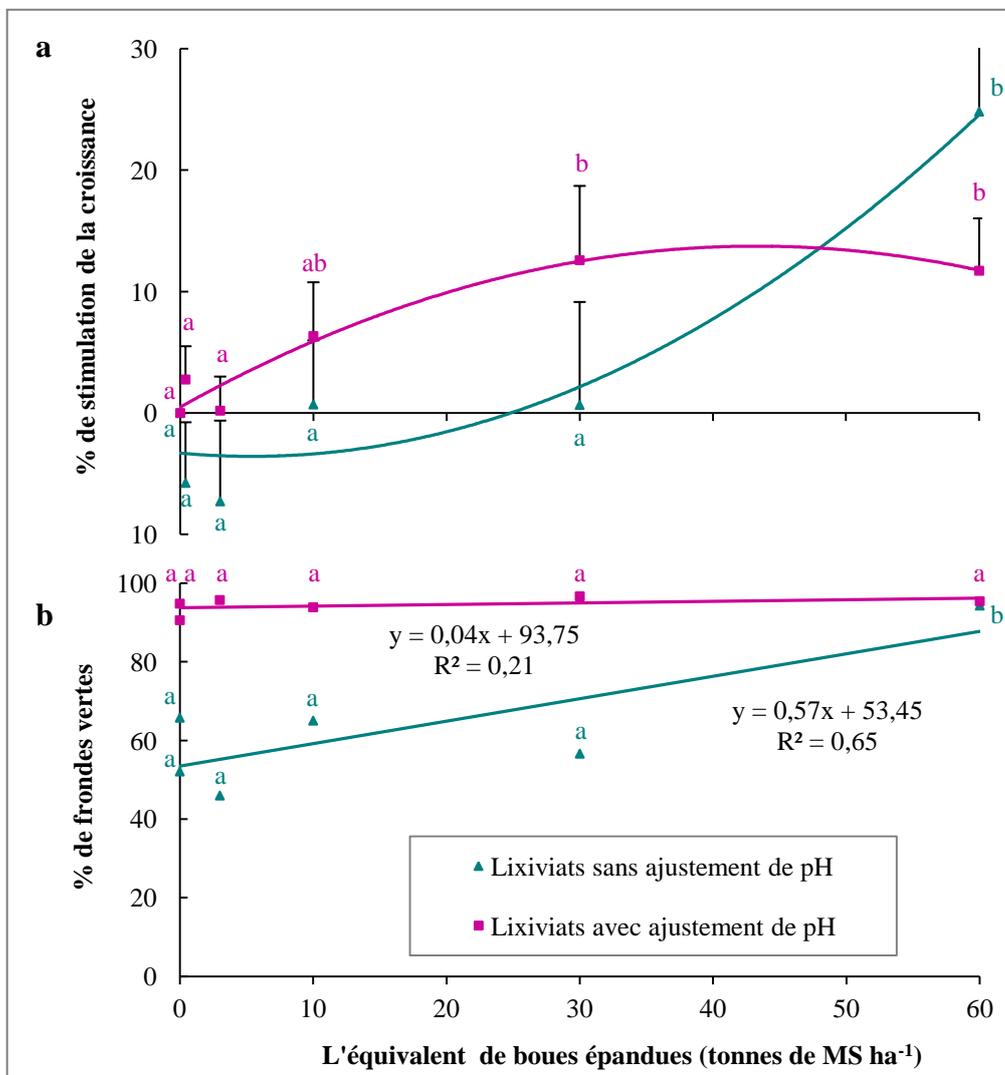


Figure 50 : Taux moyen de (a) stimulation de la croissance et (b) de frondes vertes des lentilles d'eau exposées aux lixiviats. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5). Les lettres indiquent les différences significatives entre les différents traitements.

3. COMPOSITION DES LIXIVIATS EN ELEMENTS MINERAUX ET EN ELEMENTS TRACES METALLIQUES

Dans le tableau suivant (**Tableau 17**) sont présentées les teneurs en éléments minéraux et en éléments traces métalliques des lixiviats à pH non ajusté. Ce tableau montre un enrichissement des lixiviats en P, en K, en Ca et en Mg avec l'apport des boues. On constate également que les teneurs en Zn et en Al augmentent significativement, tandis que les concentrations des autres ETM (Cu, Pb et Cd) sont inférieures à la limite de détection.

Tableau 17 : Teneurs en éléments minéraux et éléments traces métalliques des différents lixiviats (moyenne±écart-type ; n=5). Les lettres indiquent les différences significatives entre les différents apports de boues :

	Apports de boues (t MS ha ⁻¹)					
	0	0,4	3	10	30	60
P (µg L⁻¹)	< LDM	< LDM	15,02 ± 1,51 ^a	42,41 ± 5,64 ^b	129,57 ± 3,71^d	92,78 ± 9,64 ^c
K (mg L⁻¹)	3,87 ± 0,88 ^a	2,96 ± 0,40 ^a	4,33 ± 0,34 ^a	6,62 ± 0,98 ^b	9,68 ± 0,12^c	8,39 ± 0,79 ^c
Ca (mg L⁻¹)	1,33 ± 0,08 ^a	1,34 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,1 ^a	1,22 ± 0,09 ^a	1,94 ± 0,20^b	3,33 ± 0,23 ^c
Mg (mg L⁻¹)	0,67 ± 0,06 ^a	0,57 ± 0,11 ^a	1,33 ± 0,16 ^b	2,84 ± 0,30 ^c	5,45 ± 0,07^e	3,47 ± 0,30 ^d
Al (mg L⁻¹)	2,71 ± 0,38 ^a	2,98 ± 0,77 ^a	12,20 ± 2,02 ^b	29,89 ± 1,81 ^c	61,78 ± 0,59^d	25,62 ± 4,25 ^c
Cu (µg L⁻¹)	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Zn (µg L⁻¹)	6,24 ± 0,16 ^a	< LDM	11,09 ± 4,62 ^a	26,11 ± 4,80 ^b	67,66 ± 7,21^c	23,68 ± 5,13 ^b
Pb (µg L⁻¹)	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Cd (µg L⁻¹)	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM

4. DISCUSSION

L'épandage des boues de STEP favorise l'accumulation de la matière organique dans la couche superficielle du sol (**Chapitre I**). Sous l'influence de l'activité microbienne du sol, ces fragments de matières organiques se décomposent et libèrent les éléments fertilisants (nitrates, phosphates) et de produits toxiques biodisponibles (ETM, CTO). La mobilité de ces éléments dans les sols est influencée par une combinaison de plusieurs facteurs incluant la structure chimique, la solubilité dans l'eau, le pH des sols, leurs capacités d'échanges de cations, leur teneur en calcaire (nature calcaire ou sableuse des sols), leur teneur en matière organique ou encore la température. Ainsi, ces éléments auront tendance à être transférés par ruissellement vers les eaux de surface, ce qui provoquerait une eutrophisation des écosystèmes aquatiques, ou bien par entraînement (notion de mobilité) vers les eaux souterraines affectant la qualité de ces eaux destinées à la consommation humaine.

4.1. L'AZOTE MINERAL

L'apport en équivalent d'azote total par l'épandage des boues liquides effectué en 2010 est de 216 kg ha^{-1} . En considérant les 20 premiers centimètres du sol, cet apport ne représente que 9 % du stock initial en azote total. La composition de la solution du sol en azote minérale montre que les quantités d'ammonium et de nitrites sont restées trop faibles, tandis que la forme nitrate s'est révélée prédominante. Un constat similaire a été souligné par **Bahri (1992)** dans son étude relative à la composition azotée des eaux de drainage d'un sol agricole amendé avec des boues urbaines. Les nitrates sont considérés comme des éléments facilement lessivables et sont transportés par pure gravité en raison d'une faible interaction avec les particules du sol par le sol chargées négativement. Ces nitrates ont pu être entraînés par la solution du sol jusqu'à 20 cm de profondeur, mais uniquement dans le premier mois qui suit l'épandage. Cependant, la quantité détectée (6 mg L^{-1}) est très faible comparée à la limite européenne pour les eaux potables (50 mg L^{-1}). Après trois mois de l'application des boues, l'évolution des teneurs en nitrates de la solution du sol est semblable. Ceci suggère que la part de l'azote organique apportée par les boues évolue par la suite de façon similaire à celle de la matière organique initialement présente dans le sol. Différentes études montrent que la concentration en nitrates dans la solution du sol augmente après épandage de boues de STEP. Nos résultats sont cohérents avec ceux de **Carnus et al. (2007)** qui montrent que la concentration en nitrates dans la solution du sol, prélevée à 20 cm, augmente significativement par rapport au témoin après chaque épandage des boues liquides ($3 \text{ t MS ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$). Cependant, les concentrations maximales atteintes sont légèrement plus élevées et sont de l'ordre de 20 à 25 mg L^{-1} . Par contre, ils ont observé que les boues compostées semblent avoir un effet assez faible sur la concentration en nitrates dans la solution du sol. Ces auteurs ont supposé que cette différence entre les boues liquides et les boues compostées s'explique probablement par la forme de l'azote dans les 2 produits : les boues compostées apportent une grande quantité d'azote organique, plus lentement minéralisable, bénéfique à plus long terme et minimisant les risques de lessivage, tandis que les boues liquides apportent principalement de l'azote minéral, plus facilement et rapidement lessivable. **Shepherd (1996)** a souligné que le lessivage des formes d'azote minéral est influencé par la proportion de chacune de ces formes dans les boues épandues, influencée elle-même par la méthode de traitement des eaux

usées. **Smith et Powlesland (1990)** ont classé les types de boues selon le risque de lessivage, ainsi ce risque suivrait l'ordre : liquide digérée > liquide brute > déshydratée brute > déshydratée digérée ; lorsque ces boues sont appliquées à des taux similaires en équivalent d'azote total et en conditions comparables. **Henry et al. (2000)** ont montré qu'après épandage de 2 180 kg ha⁻¹ d'azote dans des plantations d'épicéa, les quantités d'azote lessivé étaient de 73 kg ha⁻¹, 115 kg ha⁻¹ et 479 kg ha⁻¹ respectivement pour des peuplements âgés de 15, 1 et 55 ans. En plus des quantités d'azote apportées par les boues et de l'âge des peuplements, Ces auteurs ont montré que ce lessivage dépend également des types de sol, des périodes d'épandage.

Les teneurs en nitrate de l'eau de la nappe et de la source n'ont pas été affectées par les boues. Ce résultat est en accord avec celui de **Carnus et al. (2007)** qui souligne l'absence d'effet des boues sur l'eau des nappes. Par contre, **Bahri (1992)** a démontré que l'épandage massif de boues résiduelles urbaines sur les sols présente des risques de pollution des nappes par les nitrates. Ces risques sont comparables à ceux résultant d'apports d'engrais chimiques. En effet, **Ferrier et al. (1996)** montrent que le lessivage d'azote dans des parcelles de pin sylvestre traitées avec des boues de STEP est identique à celui observé après une fertilisation avec de l'urée. Cependant, il faut être vigilant lors de l'interprétation de nos résultats, car les surfaces sur lesquelles les boues ont été épandues (6,25 m²) et les quantités apportées (l'équivalent de 3 t MS ha⁻¹ an⁻¹) sont probablement trop faibles comparées aux volumes d'eau de drainage ou circulant dans les nappes. Un apport massif de boues pourrait donc entraîner une altération des ressources en eau et engendrer ultérieurement des phénomènes de toxicité ou d'eutrophisation dans les écosystèmes aquatiques. L'étude de l'impact de l'apport des boues sur le sol (**Chapitre I**) montre que l'horizon de la litière s'est enrichi en azote organique. Même si l'apport d'azote n'est pas sous la forme de nitrate, la minéralisation de la forme organique d'azote produit plus de nitrates quand les sols sont aérés (nitrification). Cette domination pourrait conduire donc au transfert des nitrates vers les horizons profonds. Ainsi, la valorisation des boues en milieu forestier n'exclue pas un drainage éventuel des nitrates vers les eaux souterraines.

4.2. LE PHOSPHORE, LE POTASSIUM ET LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX

Il est à noter que les teneurs en P des eaux prélevées ont été inférieures à la limite de détection. **Harris et al. (1984)** et **Bahri (1992)** ont indiqué également que les teneurs en ions phosphate des eaux de drainage étaient trop faibles comparées aux nitrates. Par contre, **Carnus et al. (2007)** ont observé que les phosphates se comportent de façon similaire aux nitrates avec une augmentation dans la solution du sol qui apparaît 2 mois après l'épandage des boues liquides. Nos résultats sont influencés par le comportement du P dans le sol. Dans les boues, comme dans le sol, la majeure partie du P est présente sous la forme inorganique (**Frossard et al. 1994 ; Singh et Agrawal, 2008**). Cependant, la teneur en phosphate de la solution du sol est influencée par les ions phosphate présents réellement dans la solution (P dissout, très faible) d'une part, et les ions phosphate de la phase solide du sol susceptibles de passer dans la solution (P mobile à faible énergie d'adsorption, dominante) et participer aux équilibres sol-solution sous l'effet du gradient de concentration et donc de réapprovisionner la solution en ions phosphate (**Morel, 2004**). La mobilité du P dépend en particulier de la nature et des propriétés des constituants du sol comme les argiles minéralogiques, les oxyhydroxydes

de Fe et d'Al, le carbonate de Ca et de la matière organique du sol (**Robert, 1996**). L'absence de migration des ions phosphate en profondeur laisse penser que les importantes teneurs en Fe et en Al du sol de Mélisey (10,9 et 22,1 mg g⁻¹ MS respectivement) devraient être à l'origine de ce comportement. En effet, dans les sols acides, l'adsorption du phosphore est généralement attribuée aux oxyhydroxydes de Fe et d'Al, ainsi qu'aux argiles (**Sanyal et de Datta, 1991**).

A l'exception du sodium, l'apport des boues de stations d'épuration n'a pas d'incidence sur les teneurs en potassium et en éléments minéraux des eaux prélevées sur le site. Ce résultat n'est pas étonnant puisqu'on a déjà constaté que les apports de ces éléments par les boues sont négligeables (**Chapitre I**). Le calcium apporté par les boues s'est immobilisé dans la litière. En effet, les ions Ca²⁺ se fixent sur les charges négatives des colloïdes argilo-humique et provoquent leur floculation, ainsi, favorisent l'humification et la formation du complexe argilo-humique (**Soltner, 1992**). Toutefois, **Carnus et al. (2007)** ont constaté une augmentation dans les concentrations des cations majeurs uniquement dans la solution du sol prélevée à 20 cm. Ces auteurs n'ont observé cette augmentation qu'après le deuxième (pour le Ca et Mg) ou le troisième épandage (pour le K). Ces auteurs supposent qu'un effet de seuil ou un effet cumulatif intervient dans la dynamique de transfert de ces éléments à travers le profil du sol. En dépit des teneurs élevées en Na dans les boues épandues (14 fois plus que la teneur initiale du sol), les concentrations de cet élément n'ont pas augmenté de manière significative, ni dans la litière, ni dans l'horizon du sol sous jacent (**Chapitre I**). Par contre, des teneurs élevées ont été enregistrées dans la solution du sol, 2 mois après l'épandage. Cette augmentation temporaire pourrait s'expliquer par la forte solubilité et donc une grande mobilité du sodium dans le sol.

4.3. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

Les teneurs en ETM des eaux prélevées n'ont pas été affectées par l'application des boues. Le Cu est l'élément métallique le plus présent dans ces boues, ainsi, la quantité apportée correspond à 10 % du stock initial lors du 2ème épandage. Par contre, le Zn ne représente que 0,8 % malgré la concentration élevée dans les boues épandues. Toutefois, ces apports n'affectent pas les teneurs de la solution du sol, des eaux de la nappe et des eaux de la source. Cette réponse peut s'expliquer par la rétention des ETM au niveau de la matière organique contenue d'une part, dans les boues et d'autre part, dans la litière, ce qui empêche leur lixiviation le long du profil du sol. Cette hypothèse est soutenue par les résultats concernant les teneurs en ETM dans la litière (**Chapitre I**). En effet, de précédentes études (**Baize et al., 2006 ; Jalali et Khanlari, 2006**) ont montré qu'une fraction importante des ETM est immobilisée par la couche de l'humus en surface par des phénomènes de précipitation, de co-précipitation et d'adsorption (**Gibert et al., 2005**). Néanmoins, la combinaison du faible pH des sols forestiers et de la diminution de la quantité de matière organique en profondeur peut représenter un risque accru de lessivage des ETM dans les sols forestiers si la charge hydrique provenant des précipitations ou de l'application de boues excède l'évapotranspiration (**Roy et Couillard, 1998**). Ces mêmes auteurs ont montré que la solution du sol prélevé à 30 cm a été contaminée par le Cd et le Zn après l'apport de boues urbaines déshydratées sur des sols forestiers. Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus

par **Carnus *et al.* (2007)** qui ont montré que les boues liquides n'ont pas d'effet sur les teneurs en ETM de la solution du sol, tandis que l'application de boues compostées a engendré une augmentation de la concentration du Pb dans la solution du sol prélevée à 20 cm. Ainsi, les ETM, étudiés lors de cette expérience, se retrouvent immobilisés dans la l'horizon de surface, y compris le Zn réputé très mobile.

4.4. L'IMPACT DES BOUES SUR LES LENTILLES D'EAU

Les résultats obtenus sur la croissance des lentilles d'eau témoignent de la forte implication du facteur pH. L'acidité du milieu limite leur prolifération. Cependant, il est à noter que le pH des eaux de surface est déterminé, en partie, par la nature géologique du bassin de drainage et est influencé aussi par les précipitations et l'activité biologique du sol (**Painchaud, 1997**). En effet, le pH joue un rôle très important sur l'absorption des éléments nutritifs par la plante et influe ainsi sur le taux de croissance (**Driever *et al.*, 2005**). Dans le cas de l'apport d'une forte dose de boues (60 t MS), une hausse importante de pH (6,1) a été observée ce qui entraînerait la précipitation d'Al et donc une baisse des teneurs en aluminium en solution. En effet, l'Al peut se lier au phosphore pour former un complexe stable après adsorption (**Makris *et al.*, 2005**). Ainsi, la forte stimulation de la croissance des frondes de lentille d'eau observée après apport de 60 t MS peut s'expliquer d'une part (i) par la réduction de la toxicité de l'aluminium après précipitation et d'autre part (ii) par l'enrichissement en EM après l'apport des boues. Pour l'apport de 30t MS, la croissance des frondes est inhibée en dépit de l'augmentation significative des teneurs en EM indispensables (P, K, Ca & Mg). Cependant, il est très difficile de discriminer l'effet pH de celui de la toxicité liée à la présence de l'Al en solution.

Les lentilles d'eau sont également utilisées comme plantes bioindicatrices du phénomène d'eutrophisation liée à des rejets locaux de phosphore et d'azote via les STEP (**Khan et Ansari, 2005**). Les effluents de STEP et les eaux d'écoulement en provenance des parcelles fortement amendées peuvent contribuer à l'accumulation des ces éléments nutritifs dans les écosystèmes aquatiques (cours d'eau, étangs, lacs...). Cette accumulation provoque la prolifération des plantes aquatiques (lentilles d'eau, algues...) conduisant ainsi au phénomène d'eutrophisation qui affecte la faune de ces écosystèmes (**Khan et Ansari, 2005**). Toutefois, l'épandage des boues est très réglementé. La restriction de cette pratique à proximité des points d'eau et sur des parcelles à forte pente (**Annexe 4**) (**Arrêté du 8 janvier 1998**) permet de limiter la contamination des écosystèmes aquatiques.

5. CONCLUSION

L'étude de l'impact des boues sur le sol a montré un enrichissement de l'horizon supérieur du sol en N, en P et en ETM (**Chapitre I**). La lixiviation de l'azote mesurée à 20 cm de profondeur reste faible. Cependant, il convient de souligner le risque potentiel de contamination de la nappe par les nitrates. La migration du P et des ETM dans le profil du sol n'a pas été observée. Il est probable que ces éléments sont retenus en surface soit par la matrice solide du sol (pour le P), soit par la matière organique (pour les ETM). L'interprétation de ces résultats implique une obligation de prudence car :

- Les surfaces sur lesquelles les boues ont été épandues (6,25 m²) et les quantités apportées (l'équivalent de 3 t MS ha⁻¹ an⁻¹) sont probablement trop faibles comparées aux volumes d'eau présents dans les sols. Des apports de boues trop importants pourraient entraîner une altération des ressources en eau et engendrer des phénomènes de toxicité ou d'eutrophisation dans les écosystèmes aquatiques.
- L'accroissement du stock de ces éléments dans la surface du sol pose la question du devenir à moyen et à long terme. En effet, ils sont immobilisés tant que les conditions du milieu ne changent pas. Les recherches dans ce sens doivent être poursuivies.

Chapitre III

Épandage de boues de station d'épuration en parcelles boisées :

Quels impacts sur la productivité et les transferts des éléments traces métalliques (ETM) vers les espèces ligneuses : exemple du mélèze ?

L'étude de l'impact sur le sol présentée dans la partie précédente a permis de mieux comprendre la répartition et le comportement des différents éléments le long du profil du sol. Nous avons mis en évidence que les éléments apportés par les boues de STEP n'ont pas migré vers la profondeur et que les concentrations en surface étaient très élevées.

Dans cette partie, nous allons analyser si l'apport de boues de STEP a un effet positif sur la croissance et le développement des plants de mélèze afin de déterminer l'impact sur la production de biomasse qui dépend essentiellement des teneurs en azote et en phosphore présentes dans le sol. Le transfert sol-plante des ETM constitue un des dangers les plus préoccupants associés aux épandages de boues urbaines. Cependant, la détermination des concentrations totales de ces éléments dans le sol est insuffisante pour évaluer le risque réel que représente l'épandage. Lors de cette étude, le cuivre a suscité une attention particulière. En effet, il est présent en quantité plus importante que les autres métaux dans les boues de la STEP de Mélisey qui ont été épandues sur la parcelle expérimentale ($843,8 \mu\text{g g}^{-1} \text{MS}$). Légèrement inférieur à la valeur limite admise dans les boues à épandre ($1000 \mu\text{g g}^{-1} \text{MS}$), son cas requiert l'évaluation de sa biodisponibilité. La détermination de la fraction échangeable par extraction douce renseigne sur la fraction biodisponible qui est facilement accessible aux organismes vivants dont les plantes. Ainsi, le sol de surface enrichi essentiellement en Cu et en Zn, présenterait un risque potentiel important de transfert de ces ETM vers les plantes. Les mesures de ces transferts sont primordiales pour l'évaluation des risques représentés par la pratique d'épandage en milieu forestier.

1. ETUDE AU LABORATOIRE

1.1. LES PARAMETRES DE COISSANCE

1.1.1. LA CINETIQUE DE LA CROISSANCE DES TIGES

La cinétique de la croissance a été suivie en mesurant l'élongation de la tige, après l'apport ou non de boues, sur les plants de la récolte R₅ (18 mois de culture). Les résultats obtenus, présentés dans la **Figure 51**, ne montrent aucun effet de l'apport de boues sur la vitesse de croissance pendant les quatre premiers mois de culture. Cette période se caractérise par une croissance importante des mélèzes. A partir du 4^{ème} mois, les mélèzes ayant reçu les boues amorcent une croissance plus rapide comparée au témoin. Ce gain de croissance en hauteur est similaire quelle que soit la dose de boues apportée et est significatif à partir du 7^{ème} mois. A la récolte, les gains de croissance obtenus sont respectivement de 48 % et 66 % pour B1 et B2.

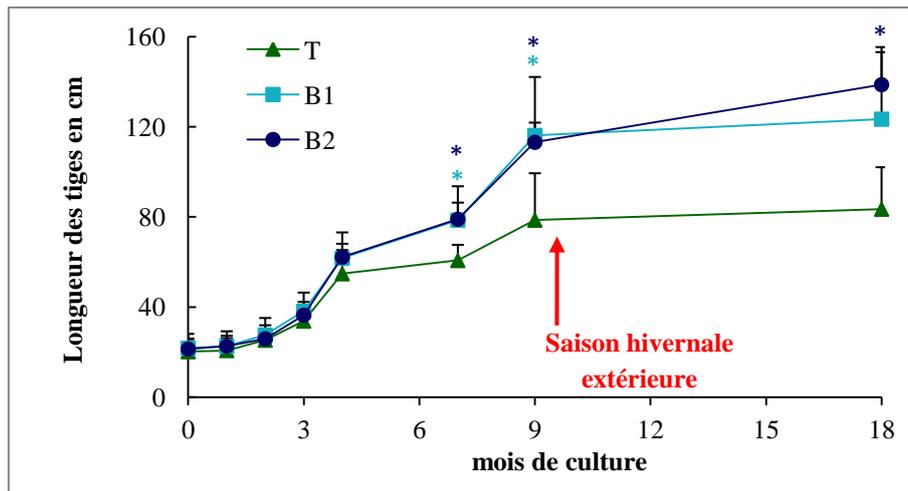


Figure 51 : Variations de la longueur des tiges des mélèzes *Larix decidua* cultivés pendant 18 mois (Récolte R₅) sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur et les astérisques représentent respectivement les écarts-types (n=5) et les différences significatives entre les traitements et le témoin (T) (*p<0,05).

1.1.2. L'ELONGATION DE LA TIGE PRINCIPALE, DES RAMIFICATIONS ET DE LA RACINE

La **Figure 52** montre l'accroissement cumulé en hauteur de la tige et en longueur de la racine à la fin de chaque période de culture. Globalement, les boues stimulent la croissance. Cette stimulation n'est significative qu'après 12 mois de culture pour les plants B2. Ainsi, l'accroissement cumulé des plants B2 est de l'ordre de 105,9 et 153,4 cm respectivement pour la tige et la racine contre 14,2 et 71,1 cm pour témoin. Chez les plants B1, les tendances à la stimulation de l'accroissement sont les mêmes avec une augmentation significative de la longueur des racines seulement de 65 % par rapport au témoin. Toutefois, un effet contraste est observé après 1,5 mois de culture, ainsi, on note une réduction non significative du gain en longueur des racines latérales des plants B2 d'environ 54,8 %. L'hiver a eu un impact négatif surtout sur la partie racinaire. La longueur totale des racines latérales est réduite significativement par rapport aux plants de la récolte de 12 mois (48 %, 61 % et 63 % respectivement chez T, B1 et B2).

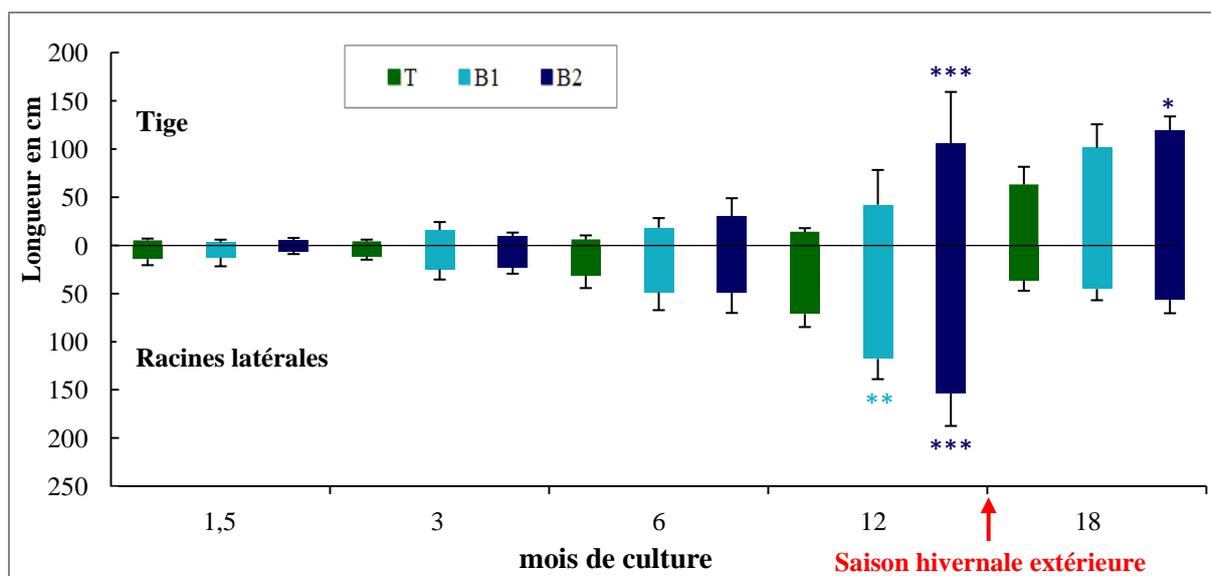


Figure 52 : Variations de la hauteur de la tige et de la longueur des racines latérales des plants de mélèze *Larix decidua* cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le Témoin à * p<0,05, ** p<0,01 et *** p<0,001.

La longueur des tiges secondaires (ramifications « Ram ») a été mesurée et la longueur moyenne par plant a été calculée. L'analyse des résultats (**Figure 53**) montre que la longueur des ramifications n'a été augmentée significativement ($\alpha < 0,05$) qu'à partir de 12 mois de culture et ce uniquement chez les plants B2.

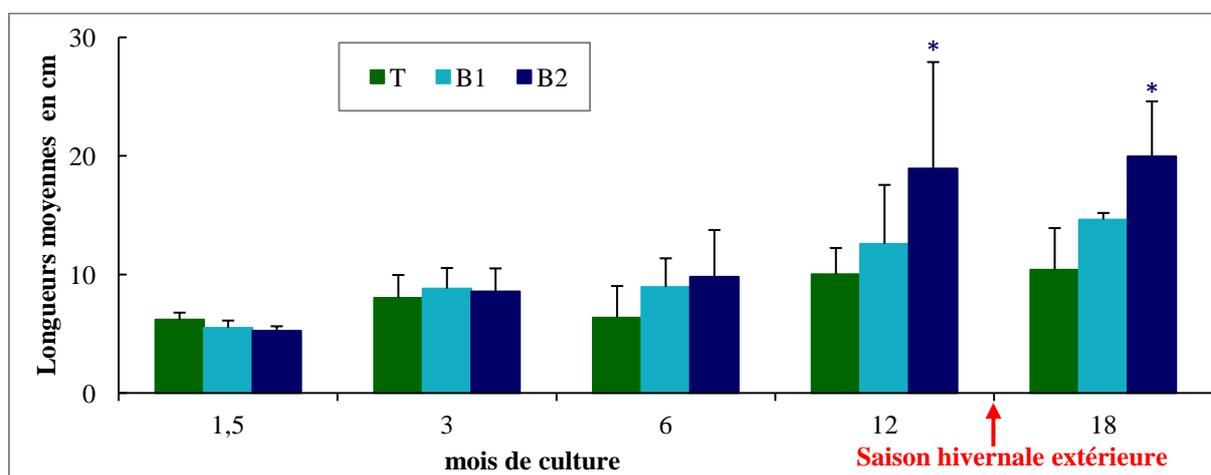


Figure 53 : Variations de la longueur moyenne des ramifications des plants de mélèze *Larix decidua* cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; * Différence significative avec le Témoin à p<0,05.

1.1.3. L'ACCUMULATION DE LA BIOMASSE

La production de biomasse sèche aérienne et racinaire a été mesurée sur les plants des différents traitements pour chaque récolte (**Figure 54**).

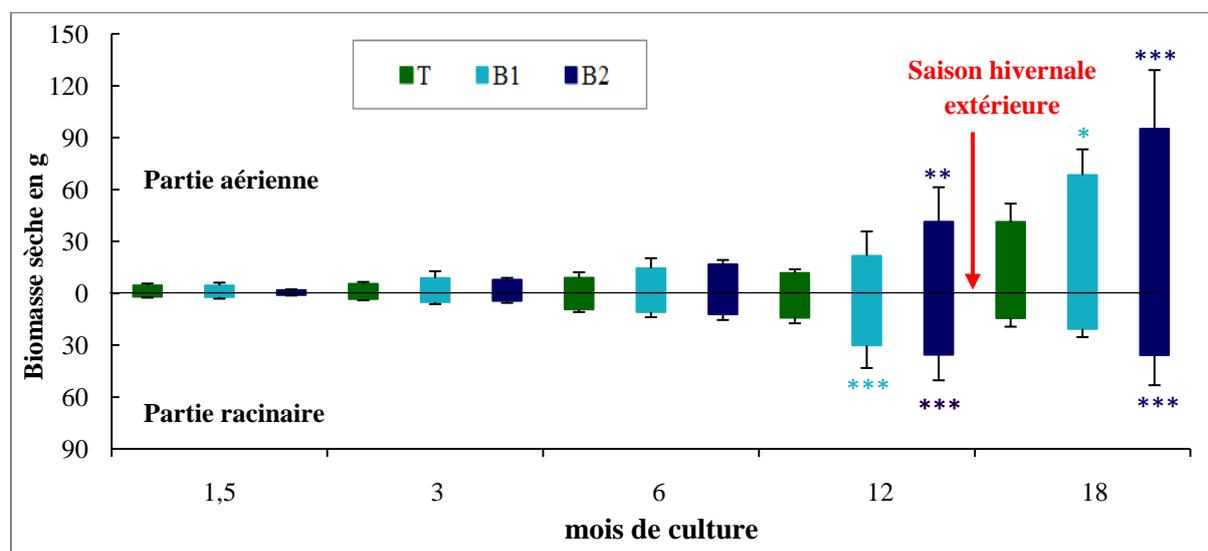


Figure 54 : Variations de la biomasse sèche des plants de mélèze *Larix decidua* cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin à * p<0,05, ** p<0,01 et *** p<0,001.

La première récolte révèle que l'apport de boues a induit une diminution significative de la biomasse sèche accumulée par les plants de la modalité B2. Le taux de réduction est de 60 % pour la partie aérienne et 51 % pour la partie souterraine. Cependant, cet effet négatif est rapidement surmonté à partir de 3 mois de culture et se traduit par une tendance à une plus forte accumulation de la biomasse sèche avec l'apport de boues. On constate que la masse sèche de la partie aérienne et souterraine des jeunes plants de mélèze augmente significativement (p<0,001) après 12 mois de culture avec l'apport de 60 t MS ha⁻¹. Les plants ayant subi l'hiver à l'extérieur montrent que l'apport de 60 t S ha⁻¹ améliore de 130 % la biomasse sèche aérienne accumulée alors que la biomasse racinaire produite stagne chez T et B2 ou bien se retrouve réduite de 31 % entre 12 et 18 mois de culture chez B1.

1.1.4. LE TAUX DE CROISSANCE RELATIVE « *Relative Growth Rate (RGR)* »

La **Figure 55** présente l'évolution du taux de croissance relative ou RGR. Les RGR calculés entre 0 et 3 mois sont élevés. Ainsi, les moyennes obtenues sont respectivement 0,017 ; 0,022 et 0,023 g MS g MS⁻¹ jour⁻¹ pour T ; B1 et B2. Ces valeurs ne montrent aucune différence significative. Ensuite, ils diminuent pour l'ensemble des traitements pour atteindre 0,005 g MS g MS⁻¹ jour⁻¹ en fin de culture. Par contre, entre 1,5 et 6 mois de culture, les plants de B2 présentent des RGR élevés et des différences hautement significatives par rapport aux plants témoins.

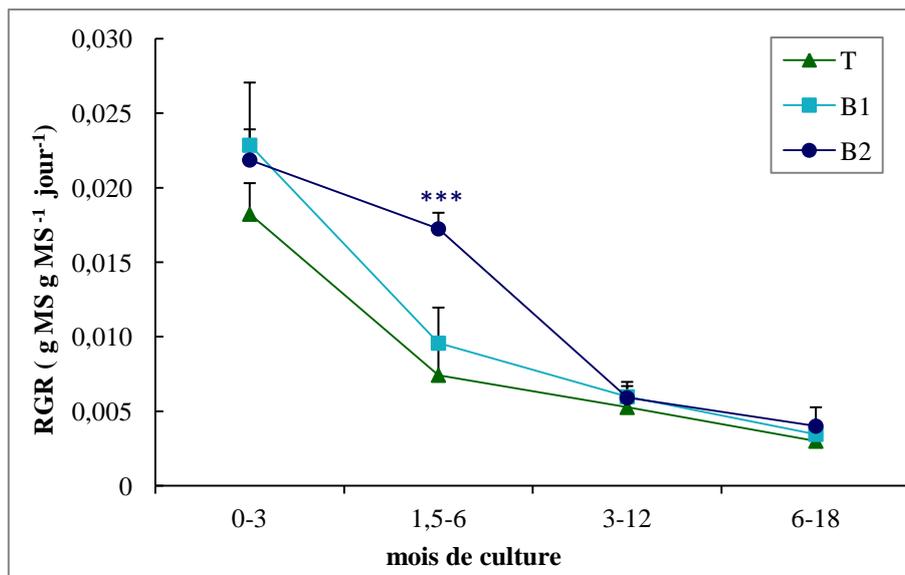


Figure 55 : Evolution de RGR : valeurs moyennes des 5 plants entre deux dates de récolte non successives. Les barres d'erreur représentent les écarts-types ; ***Différence significative avec le témoin (T) à $p < 0,001$.

1.1.5. LA CROISSANCE RADIALE

Pour pouvoir évaluer l'impact de l'apport des boues de STEP sur la croissance radiale des plants, celle-ci a été abordée lors de cette étude en déterminant trois paramètres : la circonférence, la largeur et la surface des cernes d'accroissement annuel (**Figure 56**).

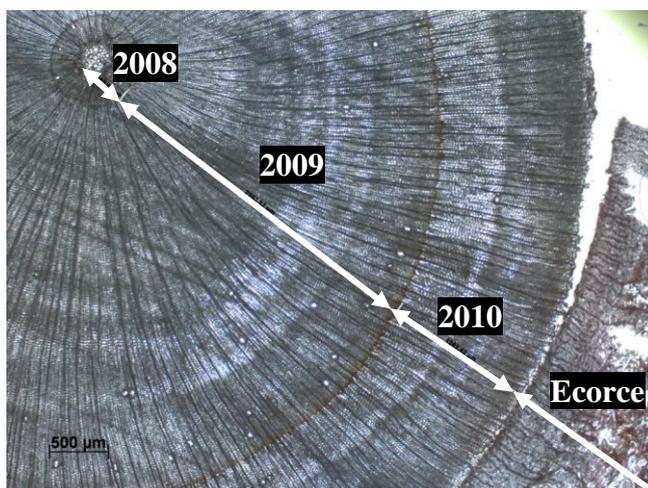


Figure 56 : Photographie d'une coupe transversale d'une tige de mélèze *Larix decidua* montrant les différents cernes de croissance.

La largeur et la surface des cernes sont considérées souvent comme un moyen de quantifier le taux de croissance. Ces deux paramètres augmentent lorsque les plants ont été amendés et l'on observe corrélativement une augmentation de la circonférence. Ainsi, après 18 mois de culture, l'augmentation de la circonférence au niveau du collet des plants B1 et B2 était respectivement de 130 % et 135 % (**Figure 57**).

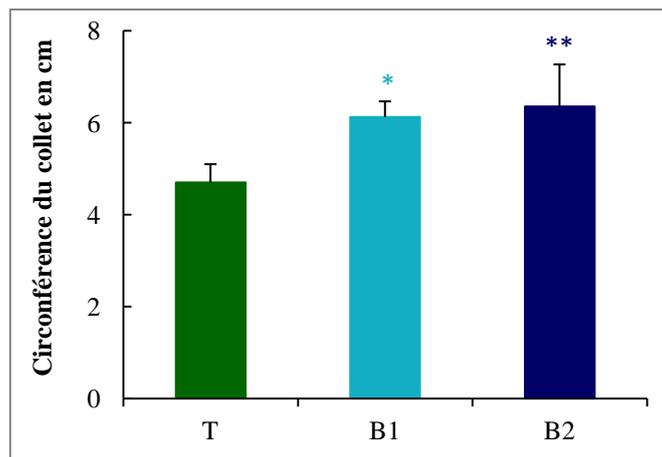


Figure 57 : Variations de la circonférence de la tige au niveau du collet entre des plants de mélèze *Larix decidua* cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin à *p<0,05 et **p<0,01.

La largeur et la surface du cerne produit en 2008 sont similaires entre les différentes modalités. Au contraire, une augmentation a été observée dans les deux années qui suivent l'apport des boues (**Figures 58 et 59**).

- La première année, le cerne produit en 2009 est significativement plus large lorsque les plants ont reçu les boues de STEP comparé aux plants témoins. Cette croissance accrue n'est pas statistiquement différente entre B1 et B2.
- La deuxième année, seuls, les plants B2 ont montré une croissance radiale supérieure à celle du témoin.

Pour les deux traitements B1 et B2, la largeur de l'écorce est similaire à celle observée chez les plants témoins T. Cependant, sa surface a tendance à augmenter chez les plants B1 et B2 sans que l'effet soit significatif.

La forte réduction de la largeur moyenne des cernes observée en 2010 comparée à celle de 2009 pourrait être corrélée à :

- l'âge : les cernes de périphérie sont plus étroits que les cernes proches de la moelle puisque le bois mis en place est réparti sur un rayon plus grand ;
- la période de croissance active : les plants de mélèze ont subi, d'octobre 2009 à mi-mai 2010, un hiver à l'extérieur.

La période de croissance active ayant été de 9 mois en 2009 et 5 mois en 2010. Il n'est pas possible d'analyser les variations interannuelles de croissance en largeur des cernes.

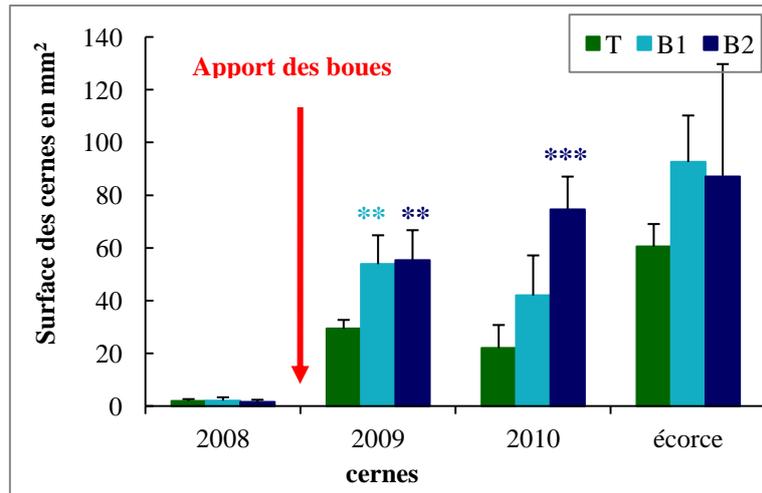


Figure 58 : Variations de la surface des cernes des plants de mélèze *Larix decidua* cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin à **p<0,0 et ***p<0,001.

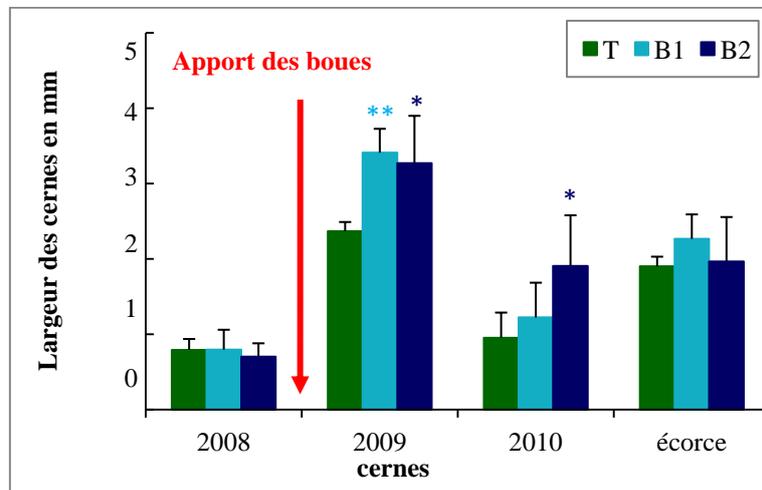


Figure 59 : Variations de la largeur des cernes au niveau du collet des plants de mélèze *Larix decidua* cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin à *p<0,05 et **p<0,01.

1.2. LES PARAMETRES CHIMIQUES

L'apport des boues stimule en général la croissance des arbres. Ainsi, les éléments contenus dans ces boues sont assimilés ou bio-accumulés différemment et peuvent se trouver dilués dans la masse végétale élaborée en plus grande quantité. Les résultats sont exprimés en quantité par organe ce qui permettra d'étudier le transfert total de l'élément étudié vers la plante.

1.2.1. L'AZOTE TOTAL

La teneur en azote total des boues appliquées est de l'ordre de 7,2 % par rapport à la matière sèche. Le taux d'azote dans les aiguilles et les racines latérales (**Figure 60**) augmente significativement avec l'apport des boues dès un mois et demi de culture. Cette augmentation a tendance à être supérieure lors de l'apport d'une quantité double de boues. On observe également que durant toute la durée de culture, le taux d'azote dans les racines latérales reste stable (entre 1 et 2 %), par contre, les aiguilles montrent une augmentation progressive quel que soit le traitement. Cette augmentation est maximale dans les aiguilles B2 qui présentent des teneurs en azote entre 1,5 et 2 % après un mois et demi de culture et entre 3,5 et 4,5 % à 12 mois de culture. A 18 mois, une chute de la teneur en N est observée dans les deux organes et aucune différence n'a été enregistrée entre les différents traitements.

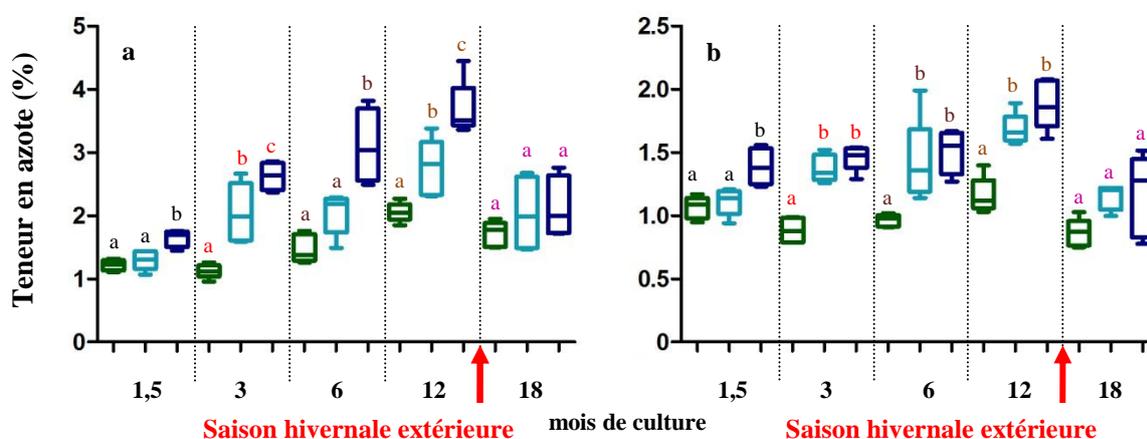


Figure 60 : Variations de l'azote total dans (a) les aiguilles (A1) et (b) les racines latérales exprimée en %. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.2. LE PHOSPHORE

La **Figure 61** montre que les teneurs totales en phosphore des RI et des A1 sont plus importantes par rapport aux autres organes. De plus, les quantités totales de phosphore augmentent dans l'ensemble des organes le long des mois de culture. Elles deviennent même très proches entre la tige principale (Tp), les ramifications (Ram) et les racines latérales (RI) à 18 mois de culture. Seules, les A1 présentent des quantités considérablement plus élevées. Le traitement B2 montre des valeurs moyennes légèrement inférieures à celles observés chez B1. A 12 mois de culture, cette augmentation devient significative dans les racines latérales de B1 et B2 et uniquement dans les aiguilles (A1) de B1. Ainsi, les quantités stockées dans les (RI) croissent de 261 % et 203 % respectivement chez B1 et B2 comparées au traitement témoin, tandis que les teneurs des aiguilles sont 73 % plus importantes chez B1 comparées à celles du témoin. En revanche, les aiguilles des plants B2 montrent une légère diminution de 5 % par rapport au témoin. Après 18 mois de culture, l'effet positif des boues sur les teneurs en P assimilé est plus marqué chez le traitement B2 dans l'ensemble des organes.

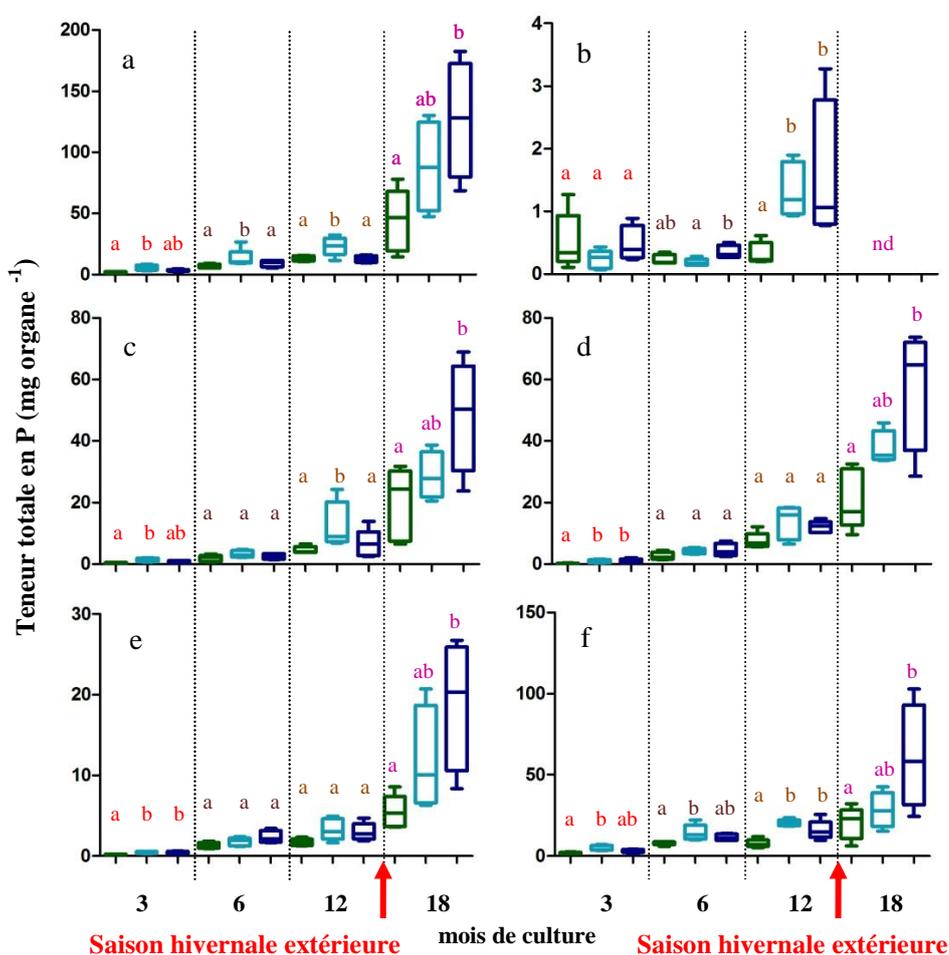


Figure 61 : Variations de la teneur totale en P exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.3. LE POTASSIUM

Tout au long de la durée de la culture, on observe une augmentation des teneurs totales en potassium dans les différents organes. Les aiguilles (A1), la tige principale (Tp), les ramifications (Ram) et les racines latérales (Rl) montrent des teneurs importantes (**Figure 62**). Après 3 et 6 mois de culture, les quantités totales de potassium sont trop faibles. Toutefois, les valeurs obtenues montrent qu'avec l'apport de 60 t MS ha⁻¹ (traitement B2), le stock en K augmente significativement chez les plants traités à partir de 12 mois de culture et ce quel que soit l'organe étudié. Un résultat similaire est observé uniquement à 12 mois de culture chez les plants B1, mais, à 18 mois de culture, les valeurs moyennes restent élevées et statistiquement indifférentes de celles observées chez les plants témoin.

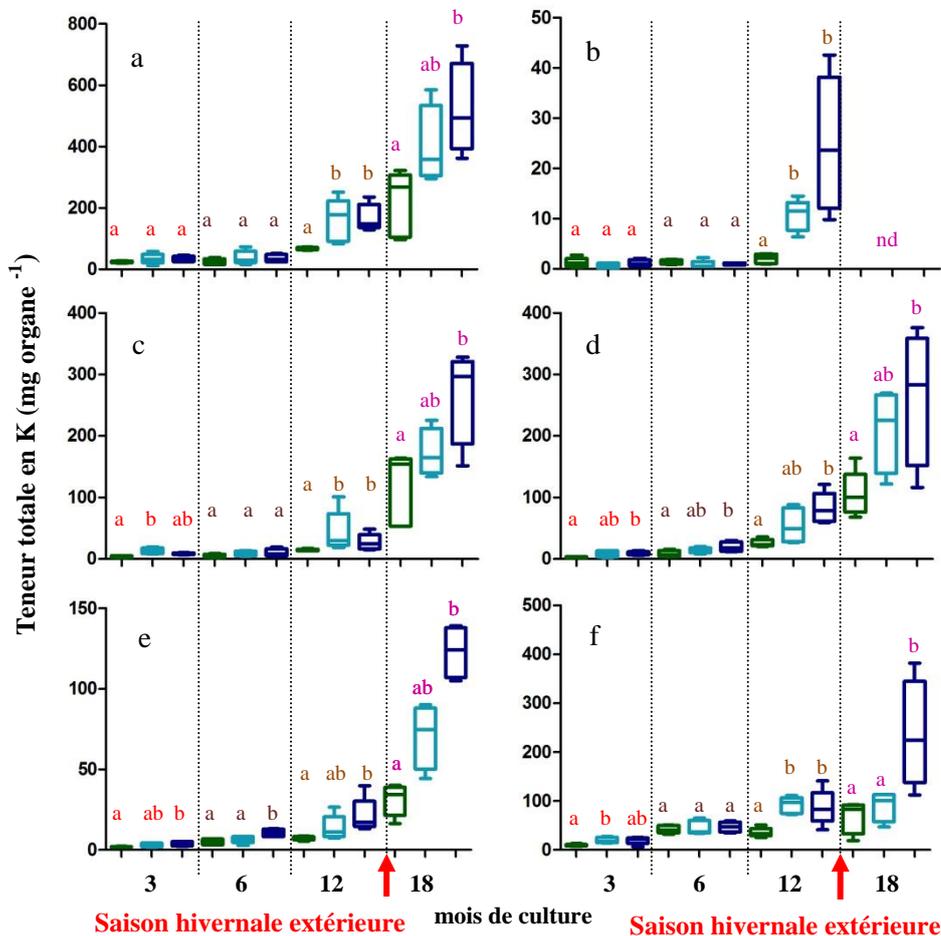


Figure 62 : Variations de la teneur totale en K exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.4. LES AUTRES ELEMENTS MINERAUX (Mg, Ca, Mn et Na)

1.2.4.1. LE MAGNESIUM

Les teneurs totales en magnésium augmentent au cours des 18 mois de culture (**Figure 63**). Cette augmentation est significative dans les aiguilles (A1), la tige principale (Tp) et les ramifications (Ram). L'effet de l'apport des boues sur les quantités totales de Mg stockées dans les organes apparaît à partir de 12 mois de culture principalement au niveau des aiguilles (A0), de la tige principale (Tp) et des racines latérales (Rl). A 18 mois de culture, l'ensemble des organes présente des teneurs élevées dans les deux modalités ayant reçu les boues comparées au témoin. Dans le cas du Mg, il semble que la majeure partie du Mg absorbée est transférée vers la partie aérienne (tige principale, ramifications et aiguilles A1).

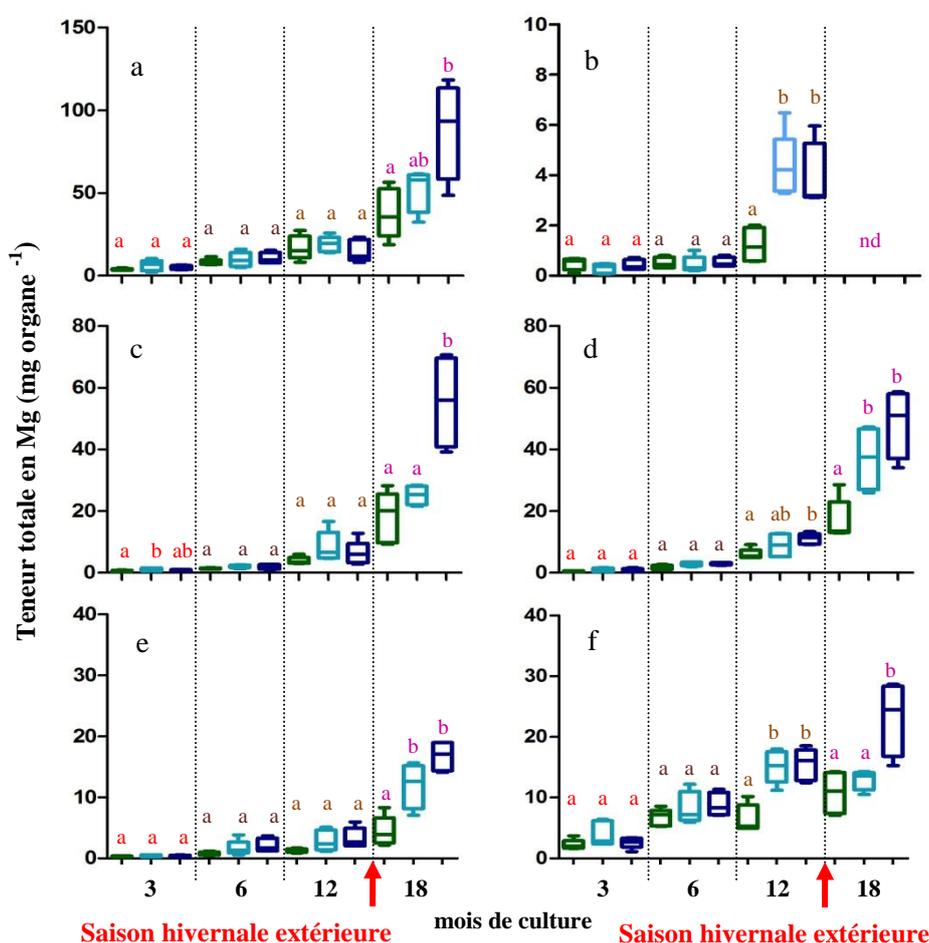


Figure 63 : Variations de la teneur totale en Mg exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.4.2. LE CALCIUM

Les quantités de calcium dans les différentes parties des plants de mélèze ont augmenté avec le temps de culture (**Figure 64**). Après 3 mois de culture, l'apport des boues a engendré une augmentation significative des teneurs en Ca uniquement dans les racines latérales des plants B1 et B2 comparées à celles du traitement témoin. En revanche, à 6 mois de culture, le stock de Ca devient significativement élevé dans tous les organes des plants de la modalité B2 - à l'exception des aiguilles (A0) - comparé au témoin, tandis qu'il reste similaire entre B1 et T. Les organes des plants B1 et B2 récoltés après 12 mois présentent des teneurs totales de Ca similaires et supérieures significativement à celles du témoin excepté dans les aiguilles (A0 et A1). Par contre, les quantités enregistrées à 18 mois sont très élevées dans les organes B2 tandis qu'au niveau de B1, elles ne sont pas significativement différentes de celles du témoin.

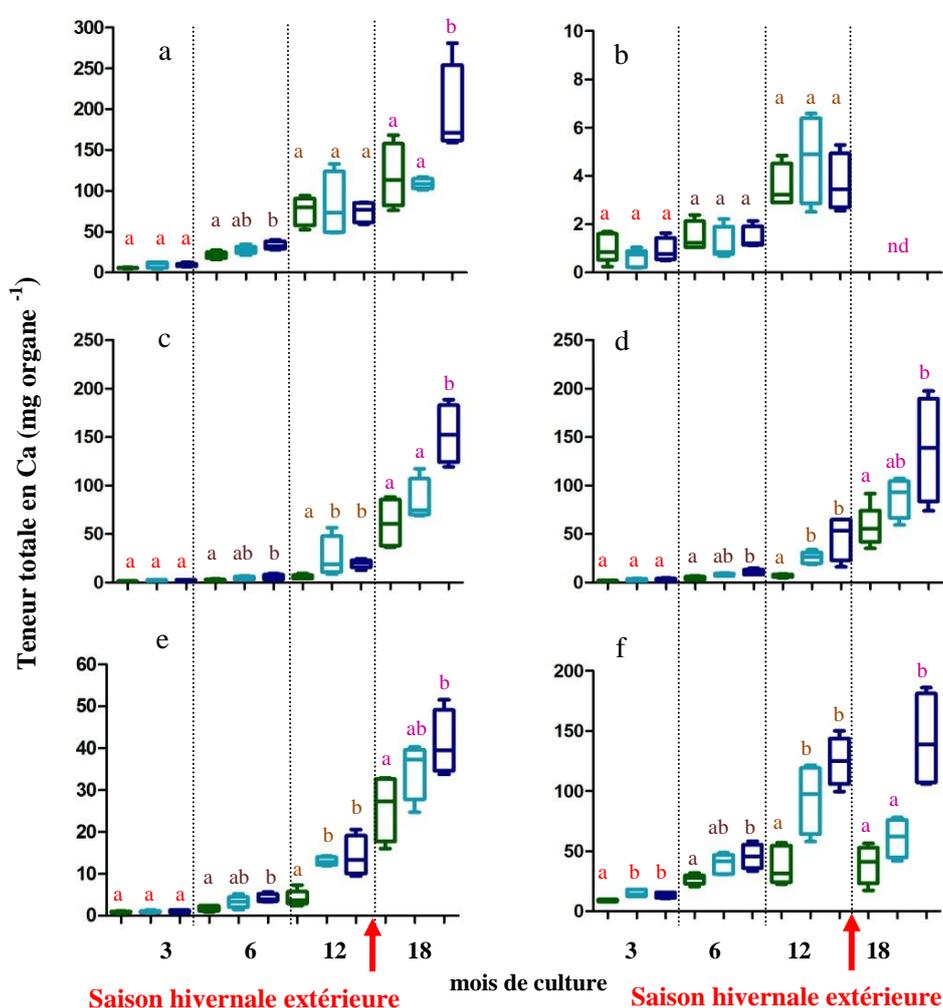


Figure 64 : Variations de la teneur totale en Ca exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.4.3. LE MANGANESE

L'ensemble des mesures concernant le stock de Mn dans les organes était significativement corrélé au temps de culture (**Figure 65**). Comme le Mg, le Mn se retrouve en plus grandes quantités dans la partie aérienne. Ainsi, le transfert de cet élément vers cette partie semble être majoritaire. Bien que les boues présentent des teneurs en Mn trop faible, il est à noter que les quantités totales augmentent dans les organes des plants amendés comparés à ceux des plants témoins. L'apport des boues a contribué à l'augmentation de ce stock en Mn d'une manière significative dans la plupart des organes B2 quelle que soit la récolte. Ce constat est aussi valable pour les organes des plants B1 mais dans une moindre mesure.

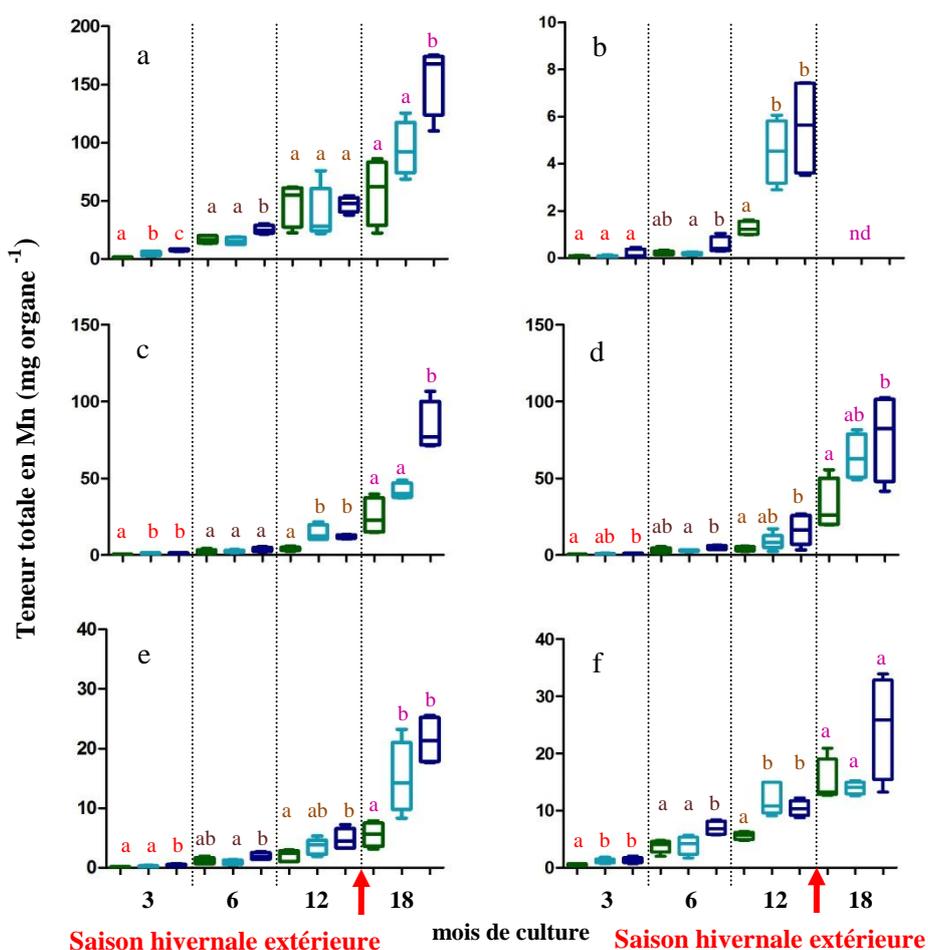


Figure 65 : Variations de la teneur totale en Mn exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.4.4. LE SODIUM

Globalement, la **Figure 66** montre que le sodium est l'élément le moins présent dans les organes. Les quantités maximales ne dépassent pas 5 et 15 mg respectivement dans les aiguilles A1 et les racines latérales. Ainsi, on remarque que les quantités transférées vers les parties aériennes sont très faibles. L'apport des boues tend à influencer positivement les teneurs enregistrées dans les organes B1 et B2. Cependant, les analyses statistiques révèlent que cet effet n'est pas toujours significatif.

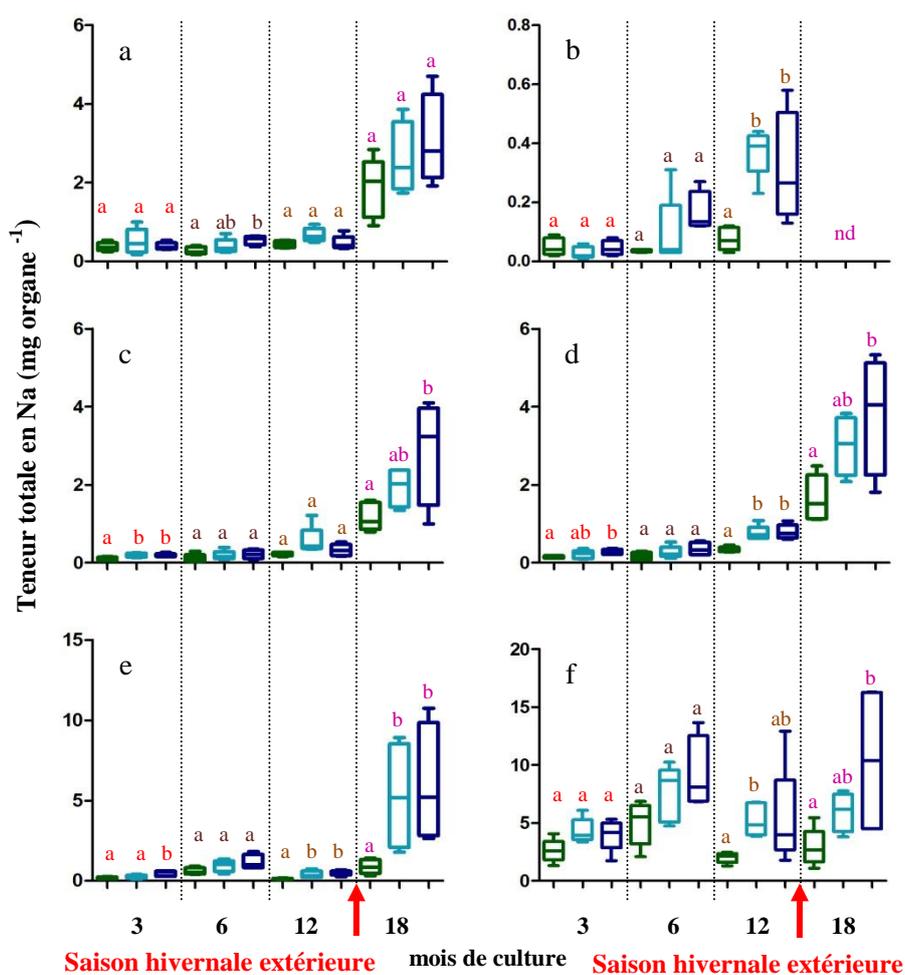


Figure 66 : Variations de la teneur totale en Na exprimée en mg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.5. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES (Cu, Zn, Pb et Cd)

1.2.5.1. LE CUIVRE

Les quantités de cuivre ont augmenté avec le temps de culture dans les différents organes à l'exception des aiguilles (**Figure 67**). Les niveaux atteints montrent qu'une grande partie du Cu est localisée dans les racines latérales. Cependant, les teneurs observées dans les organes aériens soulignent l'importante activité de transfert de cet élément. Quelle que soit la récolte, les teneurs totales ont augmenté significativement après 18 mois de culture avec l'apport des boues. Cependant, les valeurs tendent vers un niveau similaire entre B1 et B2.

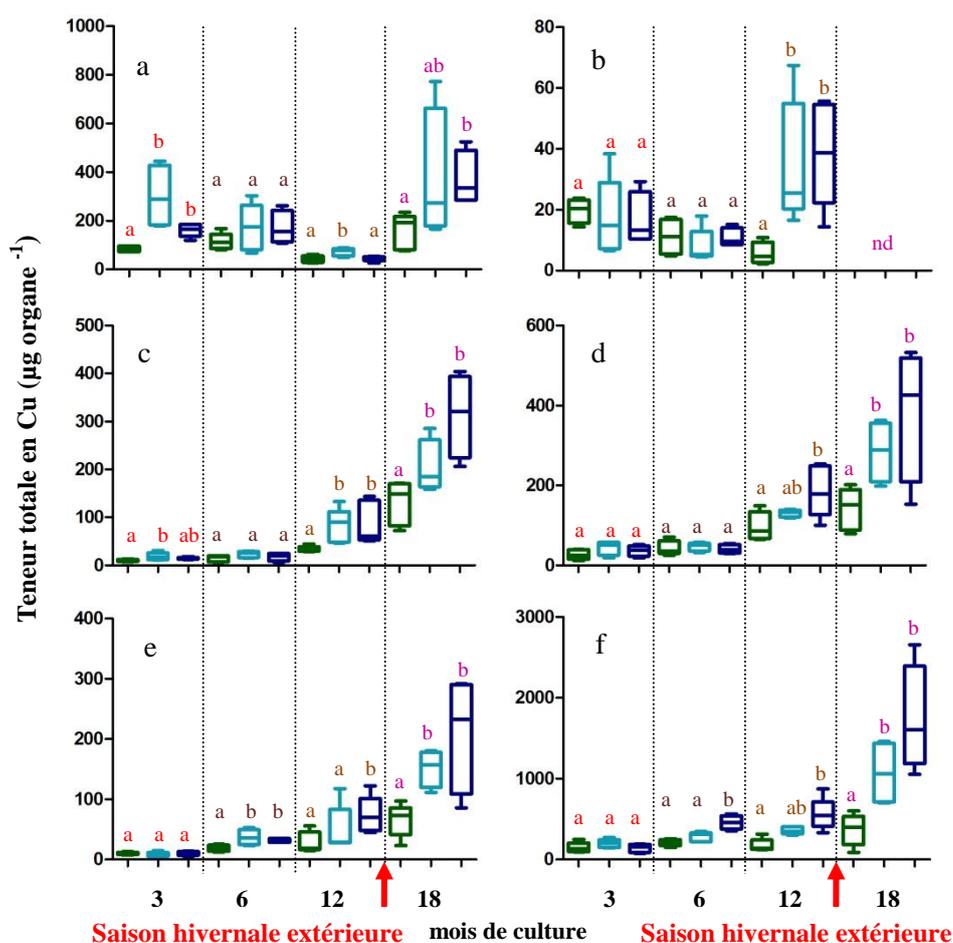


Figure 67 : Variations de la teneur totale en Cu exprimée en µg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.5.2. LE ZINC

Le Zn est l'élément trace le plus absorbé par la plante (**Figure 68**). Cependant, les valeurs enregistrées au niveau des organes aériens montrent une mobilité accrue de cet élément dans la plante, en particulier, vers les aiguilles (A1). A partir de 12 mois de culture, les quantités de Zn séquestrées augmentent significativement avec l'apport des boues. A 18 mois de culture, on peut souligner que les teneurs totales en Zn dans les aiguilles (A1) et de la tige principale (Tp) sont proportionnelles aux doses épanchées.

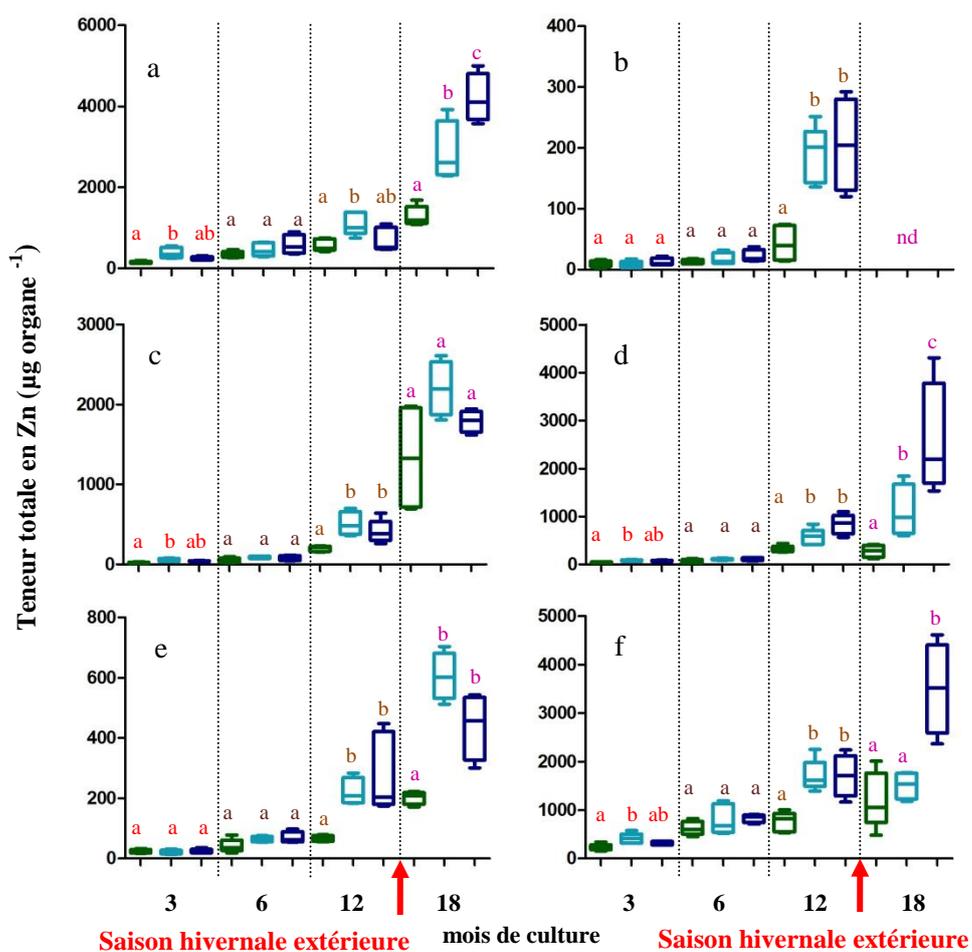


Figure 68 : Variations de la teneur totale en Zn exprimée en µg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.5.3. LE PLOMB

La **Figure 69** montre que la quasi-totalité du Pb est immobilisée dans les racines latérales (environ 100 fois plus du métal en fin d'essai). En effet, les quantités transférées vers les autres organes sont trop faibles. Dans toutes les modalités, les teneurs en Pb augmentent en fonction du temps de culture. Toutefois, aucun effet de l'application des boues sur les quantités de Pb séquestrées n'a été détecté entre les traitements B1 et B2 comparés au témoin d'une même récolte, à l'exception de certaines corrélations positives. L'analyse statistique des valeurs obtenues montre qu'à partir de 12 mois de culture, on observe une augmentation significative de la teneur totale en Pb au niveau de la racine pivot. En revanche, les racines latérales ne sont pas affectées par les amendements quelle que soit la durée de culture.

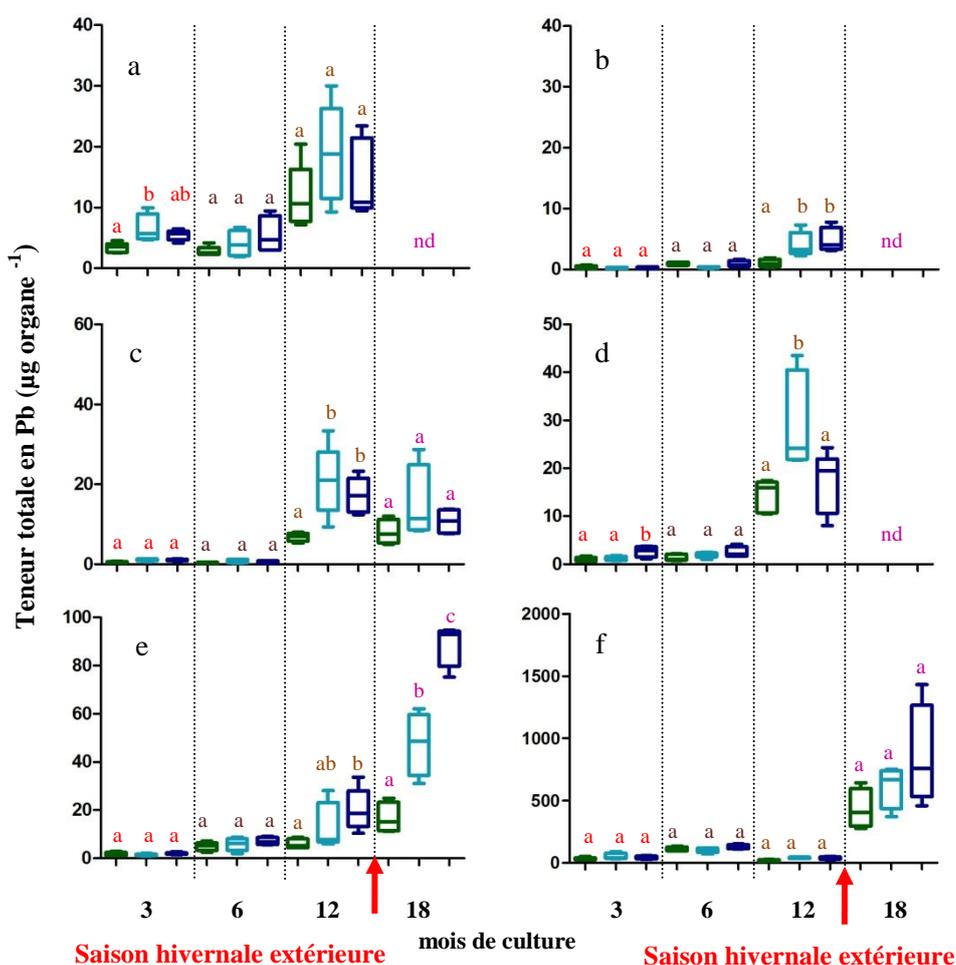


Figure 69 : Variations de la teneur totale en Pb exprimée en µg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.5.4. LE CADMIUM

Comme le montre la **Figure 70**, les teneurs totales en Cd augmentent avec le temps de culture quel que soit l'organe. Le stock immobilisé dans les racines latérales est très élevé dès 3 mois de culture comparé aux organes aériens. Cependant, c'est à partir de 12 mois de culture que ces parties aériennes présentent des quantités très importantes. Il est à noter qu'aucun effet de boues n'a été détecté dans les racines latérales. La grande variabilité observée expliquerait les faibles différences significatives.

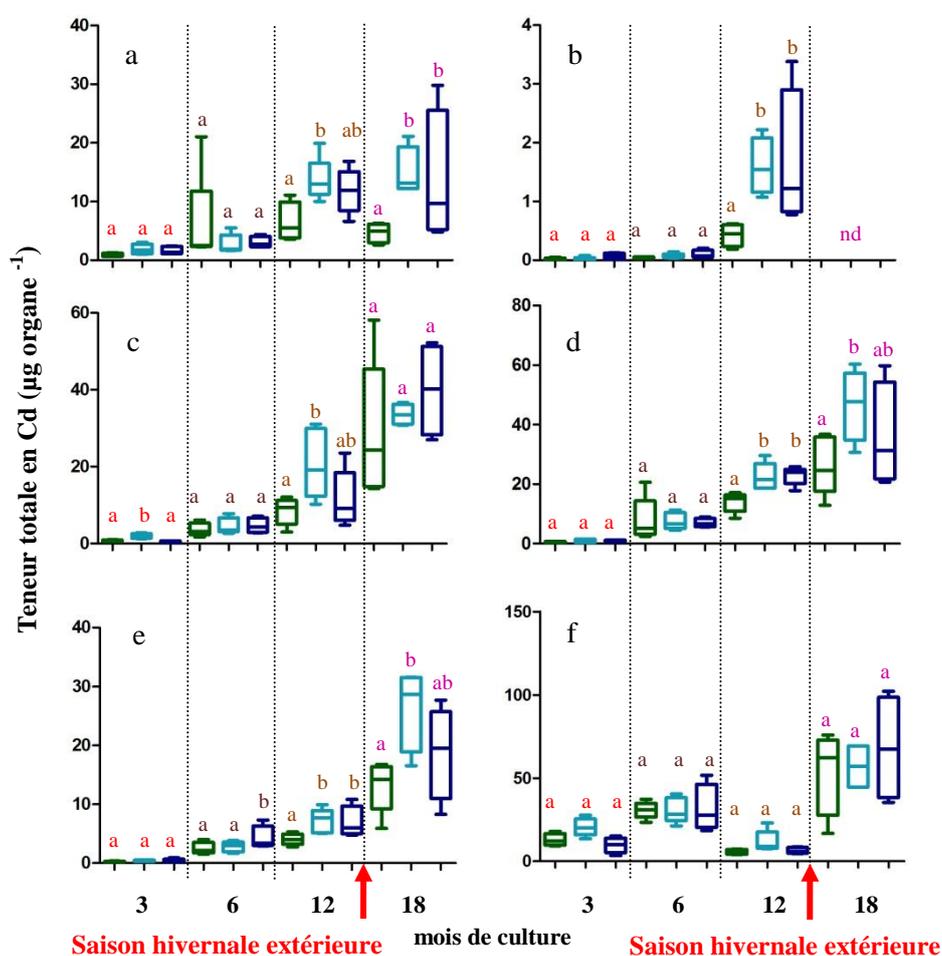


Figure 70 : Variations de la teneur totale en Cd exprimée en µg par organe (a) aiguilles A1, (b) aiguilles A0, (c) ramifications, (d) tige principale, (e) racine pivot et (f) racines latérales. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.6. DISTRIBUTION DES EM ET DES ETM DANS LES CERNES

Après avoir quantifié les teneurs totales en EM et ETM dans chaque organe de la plante, nous avons déterminé les concentrations de chaque élément présentes dans chaque cerne.

1.2.6.1. LES ELEMENTS MINERAUX (P, K, Na, Mg, Ca et Mn)

La **Figure 71** présente les concentrations en éléments minéraux dans les différents cernes. Aucune différence n'a été observée entre les modalités T, B1 et B2, et ce, quel que soit le cerne. Néanmoins, l'analyse statistique montre une augmentation très nette de la teneur en P du cerne intérieur vers le cerne extérieur (**Annexe 9**). Ce résultat est moins évident pour les autres éléments. On note également que les concentrations sont plus élevées dans l'écorce comparée à celles mesurées dans le bois.

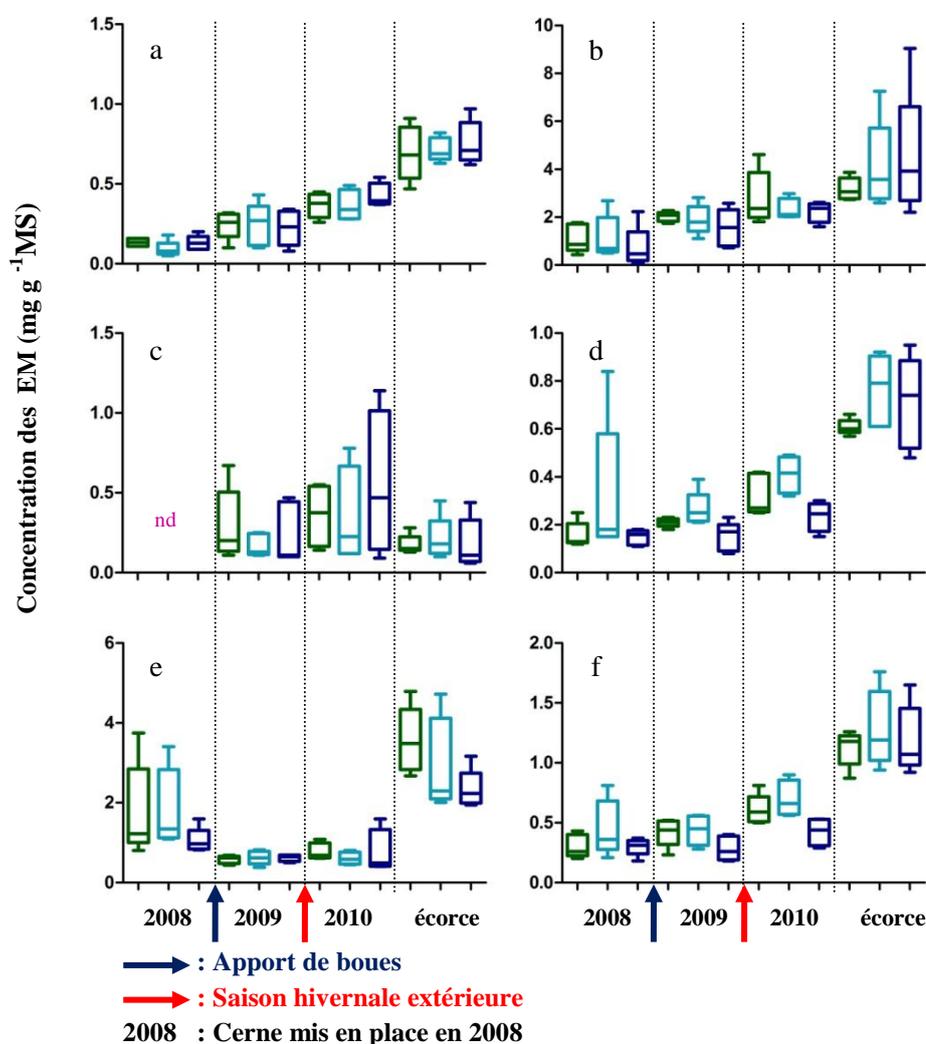


Figure 71 : Variations de la concentration des éléments minéraux (a) P, (b) K, (c) Na, (d) Mg, (e) Ca et (f) Mn exprimée en $\text{mg g}^{-1} \text{MS}$ dans les cernes formés pendant l'essai. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha^{-1} (bleu clair) et B2: 60 t MS ha^{-1} (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.2.6.2. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES (Cu, Zn, Pb et Cd)

La distribution des ETM est présentée dans la **Figure 72**. La répartition du Cu, du Zn et du Pb ne montre aucune différence significative entre les traitements. Seul, le cerne 2009 accumule plus de Zn lors d'un apport de 60 t MS ha⁻¹. Il faut tout de même mettre l'accent sur l'hétérogénéité des valeurs enregistrées pour le Pb. Les concentrations obtenues dans le cas du Cd diminuent significativement dans le cerne 2009 quelle que soit la dose apportée de boues. Cet effet persiste au niveau du cerne 2010 et de l'écorce uniquement dans le cas de l'application de 60 t MS ha⁻¹. Les concentrations en Cd sont nettement supérieures dans l'écorce d'environ 3 fois celles retrouvées dans les cernes. Par ailleurs, les teneurs en Pb sont inférieures à celles du Cd au niveau de l'écorce.

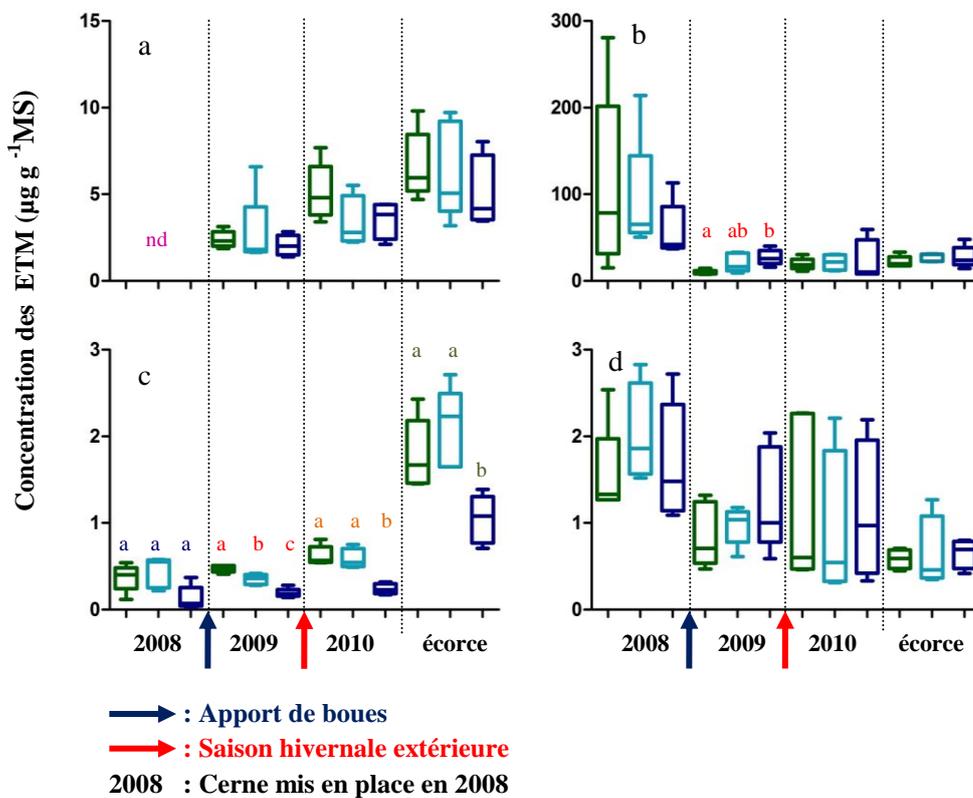


Figure 72 : Variations de la concentration des éléments traces métalliques (a) Cu, (b) Zn, (c) Cd et (d) Pb exprimée en $\mu\text{g g}^{-1}$ MS dans les cernes formés pendant l'essai. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements « Témoin (vert) ou amendé : B1: 30 t MS ha⁻¹ (bleu clair) et B2: 60 t MS ha⁻¹ (bleu foncé) par des boues de STEP » de la même récolte.

1.3. LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES

Les variations des paramètres chimiques induits par l'apport des boues peuvent influencer les processus physiologiques de la plante. Ainsi, les analyses de la nutrition minérale ont été complétées par des mesures sur des paramètres physiologiques liés au métabolisme azoté et carboné. Les données acquises ont permis de coordonner les différents paramètres avec les mécanismes de tolérance et de détoxification des ETM et de définir un état physiologique de la plante.

1.3.1. LES ACTIVITES ENZYMATIQUES

1.3.1.1. LA NITRATE REDUCTASE

Lors des deux premières récoltes (1,5 et 3 mois), l'activité de la nitrate réductase (NRA) est plus importante dans les aiguilles (A1) comparée à celle des racines latérales (**Figure 73**). Cette activité diminue significativement après l'application des boues de STEP dans les deux organes. Au premier prélèvement, la réduction est de l'ordre de 53,17 % et de 78,17 % respectivement au niveau des aiguilles des plants B1 et des plants B2 par rapport au témoin, et de 45 % et de 63 % respectivement au niveau des racines latérales pour les mêmes plants B1 et B2 comparée au témoin. Toutefois, cet effet inhibiteur persiste au niveau des aiguilles à 3 mois de culture, tandis qu'il s'annule au niveau des racines latérales qui présentent une activité très faible et similaire entre les traitements. Au-delà de 6 mois de culture, le niveau d'activité devient quasiment nul quel que soit le traitement ou l'organe.

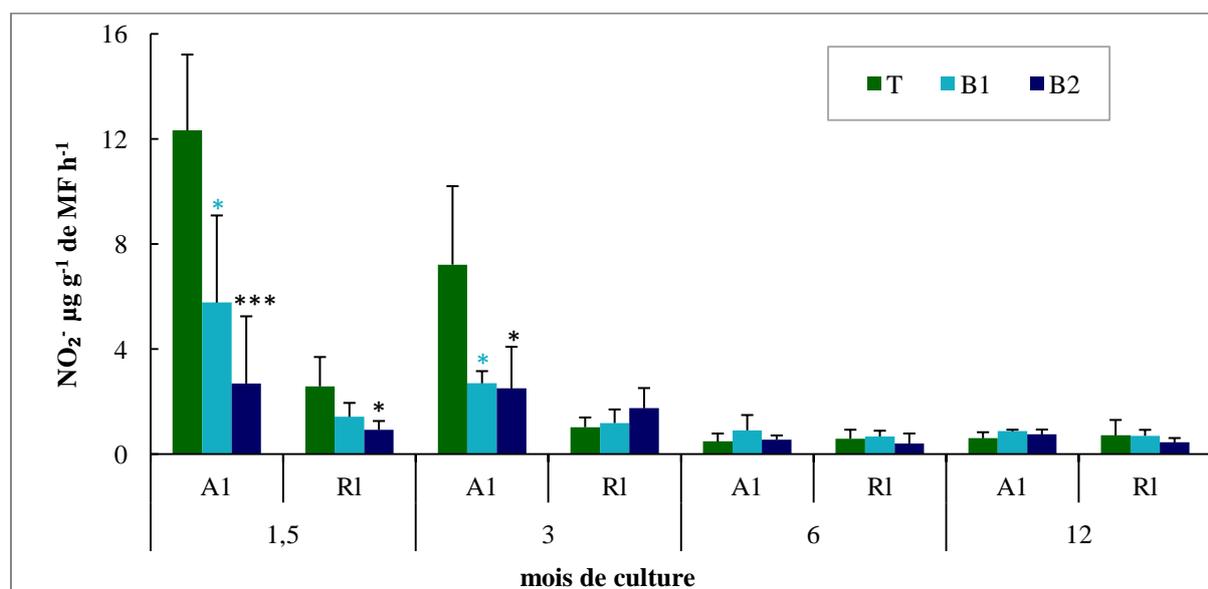


Figure 73 : Variations de l'activité nitrate réductase exprimée en $\mu\text{g} (\text{NO}_2) \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ dans les aiguilles A1 et les racines latérales des plants de mélèze (*Larix decidua*) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha^{-1} et B2: 60 t MS ha^{-1}) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; Différence significative avec le témoin (T) à *p<0,05 et ***p<0,001.

1.3.1.2. LA SUPEROXYDE DISMUTASE

L'activité SOD (exprimée en U SOD mg⁻¹. protéines) est similaire dans les aiguilles (A1) et les racines latérales (RI) (**Figure 74**). Après 1,5 mois, cette activité est en moyenne de 18,7 et 24,2 U mg⁻¹ protéines respectivement dans les A1 et les RI des plants témoins. Elle augmente significativement 4 fois plus dans les plants B1 et B2 comparés aux témoins et ce aussi bien dans les A1 que dans les RI. À 12 et à 18 mois de culture, les A1 et les RI des plants témoins présentent une activité aussi élevée que celle observée chez les plants B1 et B2, ainsi aucune différence significative n'a pu être enregistrée.

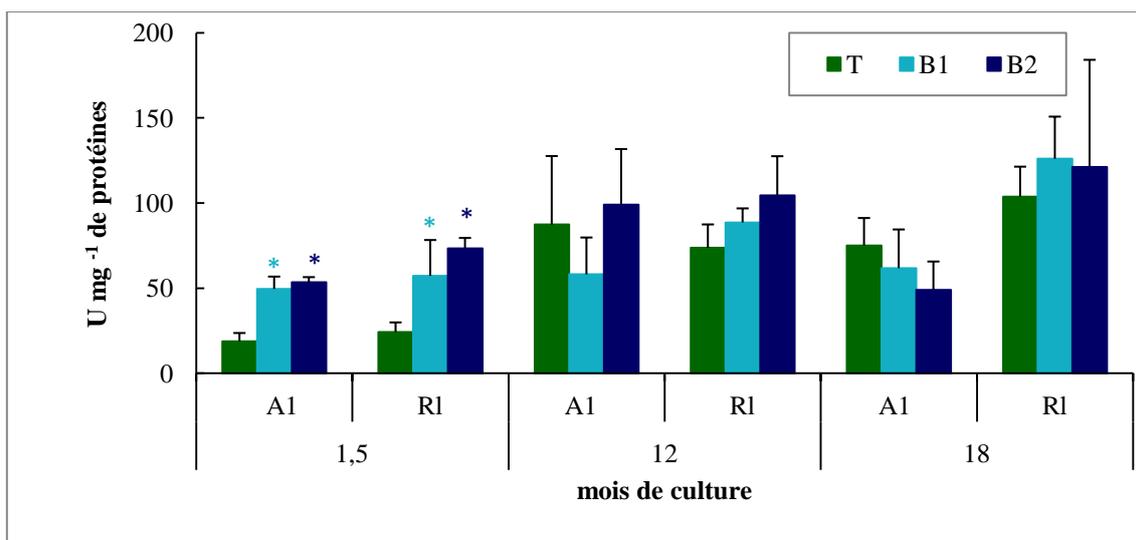


Figure 74 : Variations de l'activité superoxyde dismutase (SOD) exprimée en U mg⁻¹ de protéines dans les aiguilles (A1) et les racines latérales (RI) des plants de mélèze (*Larix decidua*) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; *Différence significative avec le témoin (T) à p<0,05.

1.3.2. LES ECHANGES GAZEUX

Les mesures des échanges gazeux ont été effectuées en 2009 et en 2010 sur les plants cultivés pendant 12 et 18 mois. Il apparaît immédiatement (**Figure 75**) que l'assimilation nette diminue significativement en août et en septembre quel que soit le traitement ou l'année de mesure, comparée aux valeurs enregistrées en juin et en juillet. Cette réduction de l'activité photosynthétique est moins marquée chez les traitements B1 et B2. Ainsi, l'apport des boues affecte positivement cette assimilation et on remarque une augmentation significative chez les plants B1 et B2 comparés aux plants T (**Tableau 18**). L'augmentation de l'assimilation est supérieure avec l'apport de 60t MS ha⁻¹ suggérant qu'elle est dose dépendante.

Tableau 18 : Variations de l'assimilation nette de CO₂ (moyenne ± écart-type) exprimée en μmol m⁻² s⁻¹ des plants de mélèze (*Larix decidua*) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par les boues de STEP. Les lettres présentent les différences significatives entre les traitements B1 et B2 comparés au témoin T.

Assimilation nette de CO ₂ (μmol m ⁻² s ⁻¹)	T	B1	B2
Jun 2009	3,3 ± 0,3 ^a	3,9 ± 0,3 ^b	4,3 ± 0,2 ^c
Juillet 2009	3,2 ± 0,2 ^a	4,0 ± 0,2 ^b	4,6 ± 0,4 ^c
Août 2009	2,4 ± 0,2 ^a	3,5 ± 0,2 ^b	3,9 ± 0,4 ^c
Septembre 2009	1,9 ± 0,3 ^a	2,3 ± 0,4 ^b	3,4 ± 0,4 ^c
Jun 2010	3,4 ± 0,3 ^a	4,3 ± 0,4 ^b	4,2 ± 0,4 ^b
Juillet 2010	3,2 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,7 ^b	4,6 ± 0,4 ^b
Août 2010	2,2 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,3 ^b	3,8 ± 0,2 ^c
Septembre 2010	1,0 ± 0,2 ^a	2,5 ± 0,2 ^b	2,8 ± 0,3 ^c

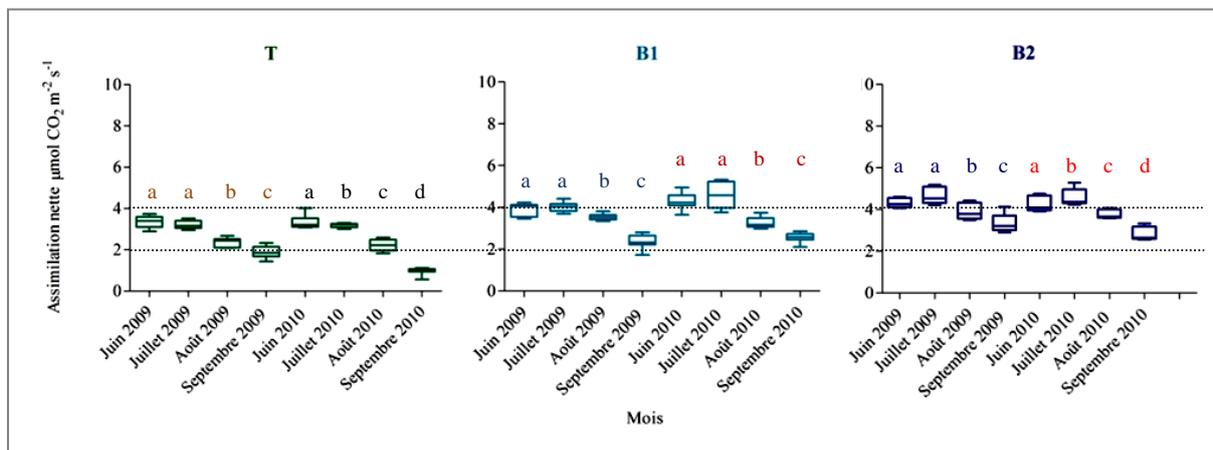


Figure 75 : Variations de l'assimilation nette de CO₂ exprimée en μmol m⁻² s⁻¹ des plants de mélèze (*Larix decidua*) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par les boues de STEP de juin à septembre. Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. Les lettres présentent les différences significatives entre les 4 campagnes de mesures de chaque traitement (n=5) et de chaque année.

1.3.3. LA CHLOROPHYLLE

Pour relier les principaux pigments photosynthétiques constitués de la chlorophylle a et b avec les résultats des échanges gazeux, les teneurs en ces molécules ont été évaluées dans les mêmes plants. Les résultats sont représentés sur la **Figure 76**. La teneur en chlorophylle a augmente significativement avec l'apport des boues. En effet, les plants récoltés à 12 mois montrent une valeur moyenne de 8 μg mg⁻¹ MS pour les deux traitements B1 et B2 accusant une augmentation de l'ordre de 35 % par rapport aux témoins. À 18 mois de culture, les plants B2 présentent des teneurs en chlorophylle a significativement supérieures (42 %) à celles déterminées chez les plants témoins mais qui ne sont pas significativement différentes de celles mesurées chez les plants B1. En revanche, l'analyse de la chlorophylle b montre qu'elle est moins affectée par l'apport des boues. Ainsi, aucune variation significative n'a été démontrée quelle que soit la durée de culture.

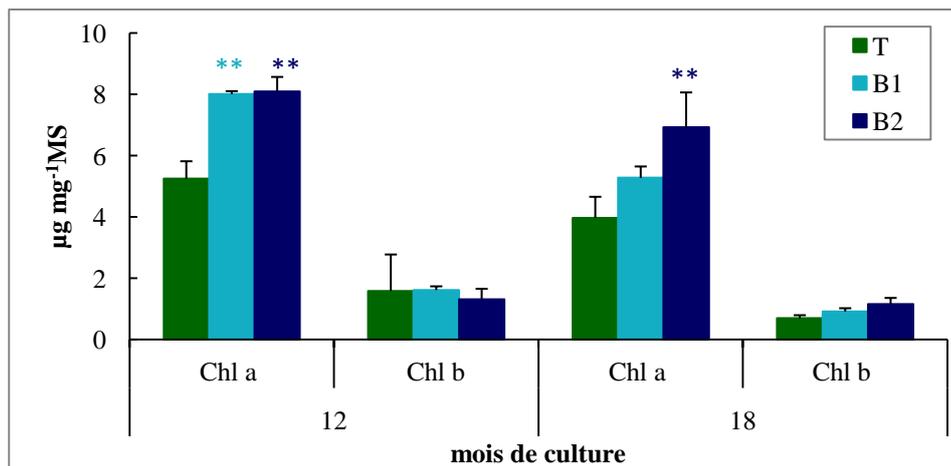


Figure 76 : Variations de la teneur en chlorophylle a et b des plants de mélèze (*Larix decidua*) cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=5) ; **Différence significative avec le témoin (T) à p<0,01.

1.3.4. LE POTENTIEL HYDRIQUE MINIMUM

Aucune différence significative nette (au seuil 5 %) n'a été observée pour les valeurs du potentiel hydrique minimum quel que soit le traitement (**Tableau 19**). Les valeurs moyennes fluctuent entre -0,81 et -1,37 MPa quelle que soit la durée de culture.

Tableau 19 : Variations du potentiel hydrique (moyenne ± écart-type) exprimé en MPa des plants de mélèze (*Larix decidua*) selon les différentes durées de culture sur sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP.

Durée de culture (mois)	T	B1	B2
1,5	-0,81 ± 0,07 ^a	-0,85 ± 0,17 ^a	-0,84 ± 0,04 ^a
3	-0,97 ± 0,18 ^a	-0,97 ± 0,16 ^a	-0,99 ± 0,16 ^a
6	-1,35 ± 0,33 ^a	-1,37 ± 0,41 ^a	-1,12 ± 0,17 ^a
12	-1,01 ± 0,09 ^a	-0,97 ± 0,19 ^a	-1,27 ± 0,21 ^a

2. ETUDE *IN SITU*

2.1. LA CIRCONFERENCE ET LA HAUTEUR DES ARBRES

La circonférence et la hauteur des mélèzes ont été mesurées au cours des automnes 2010 et 2011. Les résultats permettront d'évaluer l'effet des boues, apportées en 2008, sur ces deux paramètres. Les deux campagnes de mesure montrent une tendance similaire. A titre d'exemples, les données recueillies en 2011 sont présentées dans la **Figure 77**.

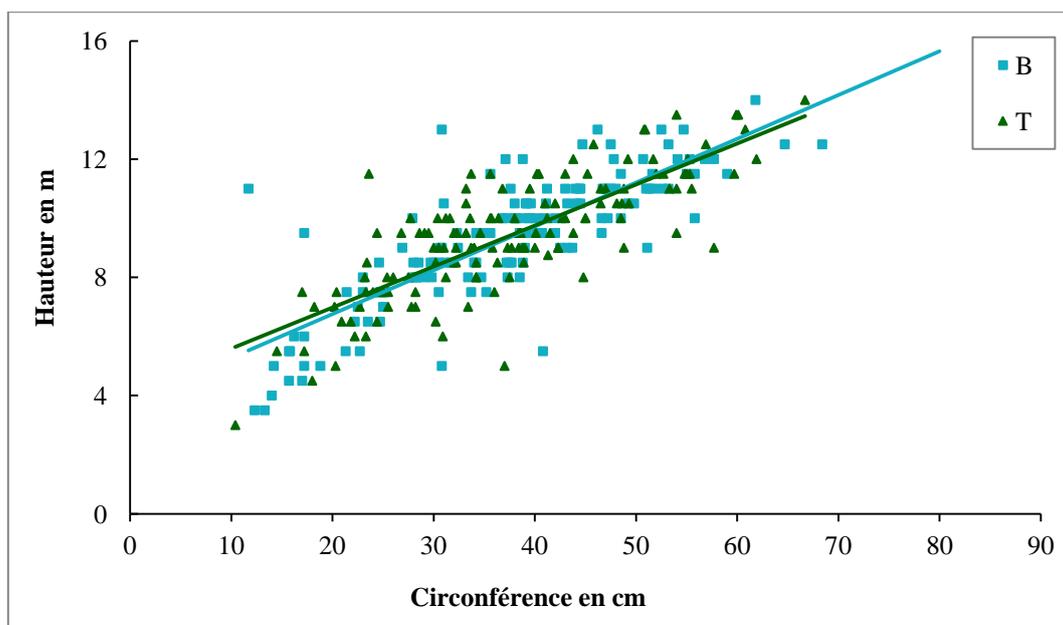


Figure 77 : La relation entre la circonférence et la hauteur des plants de mélèze *Larix decidua* témoins (T) et amendés (B) par des boues de STEP.

Les droites présentées sur le graphique de la **Figure 77** ont des coefficients directeurs très proches. Ainsi, on note une similitude entre la relation de la hauteur et la circonférence des mélèzes issus des placettes amendées (B) et ceux issus des placettes témoins (T). Ainsi, l'apport de $0,4 \text{ t MS ha}^{-1}$ n'a pas affecté la croissance des mélèzes ni en hauteur, ni en circonférence.

La disponibilité en azote et autres nutriments est un facteur environnemental déterminant pour la croissance des végétaux. Bien que les boues stimulent fortement la croissance, la mise en évidence de cet effet bénéfique n'est pas toujours possible car les écosystèmes présentent impérativement une hétérogénéité des facteurs écologiques et pédologiques. Ainsi, une étude a été réalisée afin de caractériser les zones homogènes au niveau du site de Mélisey pour pouvoir évaluer uniquement l'effet des boues. Bien que les plants aient tous le même âge, une surface terrière élevée montre une forte croissance due à un milieu propice. Ainsi, les données de la cartographie des profondeurs du sol et d'autre part, la distribution des surfaces terrières sur les placettes rendent compte de l'hétérogénéité des arbres en termes de croissance. En effet, les arbres possèdent des surfaces terrières très variables. La mise en relation de ces informations reportées sur la photographie aérienne ci-dessous (**Figure 78**) permet de définir les zones homogènes suivantes :

- Zone hydromorphe : Cette zone se trouve au nord-ouest du site et est caractérisée par la présence d'une nappe phréatique temporaire à 80 cm de profondeur. Le mélèze ne tolère pas une forte hydromorphie, ainsi, on note très peu d'individus sur cette zone.
- Zone nord : Elle recouvre l'ensemble du nord de la parcelle hors la zone hydromorphe. Le sol dans cette zone, située en haut de pente, est peu profond et les individus sont souvent exposés au vent des hauteurs. Par conséquent, la surface terrière et la densité du peuplement sont faibles.
- Zone sud-est : Cette zone est peu étendue et recouvre une partie du sud-est de la parcelle. Située en bas de pente, elle se définit par des profondeurs de sols importantes que dans la zone nord. Les mélèzes qui s'y développent présentent des surfaces terrières et une densité de peuplement importantes.
- Zone sud-ouest : Les profondeurs du sol dans cette zone vont de 85 à 120 cm. Les surfaces terrières et la densité de peuplement sont les plus importantes de toute la parcelle.

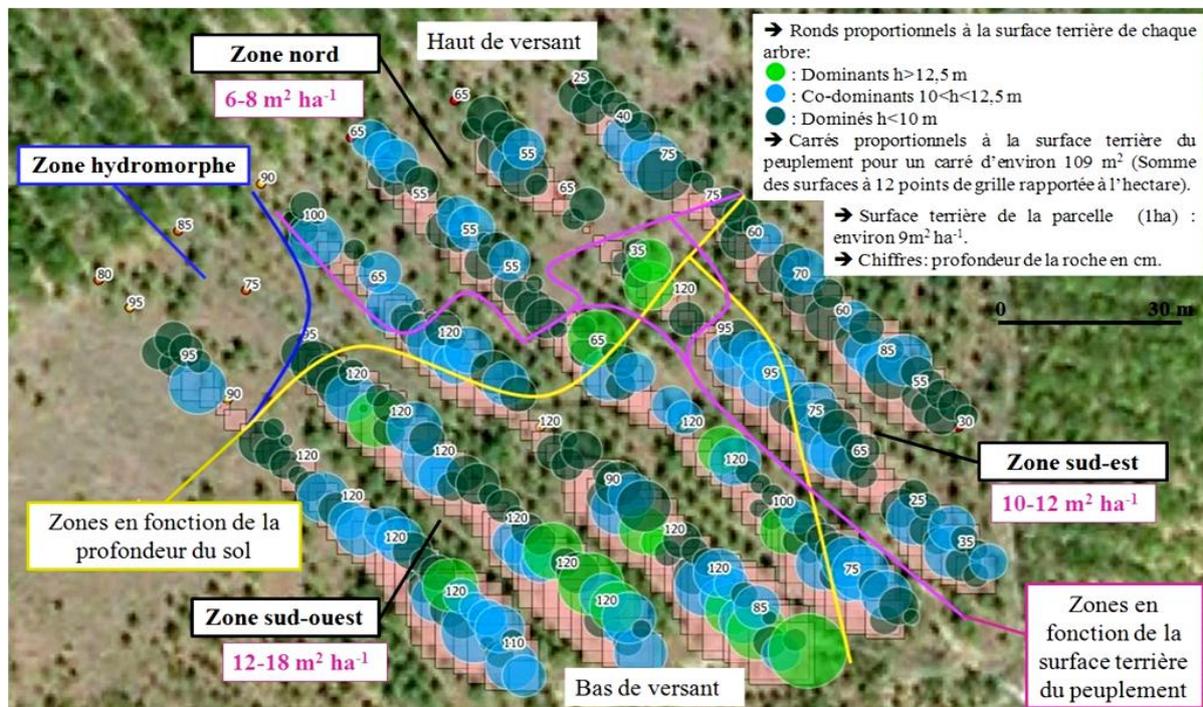


Figure 78 : Cartographie des zones homogènes définies en fonction des données dendrométriques et pédologiques de la parcelle.

Il semble que les surfaces terrières et les densités de peuplement soient plus élevées en bas de pente, sur des sols profonds. L'analyse de ces zones montre donc un lien direct entre le sol et le développement du peuplement de mélèze. La forte profondeur du sol, l'abri du vent et la faible hydromorphie favorisent donc la croissance des mélèzes. L'hétérogénéité du milieu semble donc trouver son origine dans les paramètres pédologiques et topographiques du site d'étude et non dans l'épandage des boues d'épuration. Ce constat a été confirmé par les analyses biochimiques (teneurs en N, P et ETM). En effet, les cernes mis en place de 2007 à 2010 ont été séparés et analysés en fonction des traitements (B' et T') mais aussi en fonction des zones définies précédemment. Ainsi, aucun effet de l'apport des boues sur les paramètres biochimiques n'a été observé au sein des zones homogènes. L'exemple du phosphore est présenté à titre d'illustration (**Figures 79 et 80**).

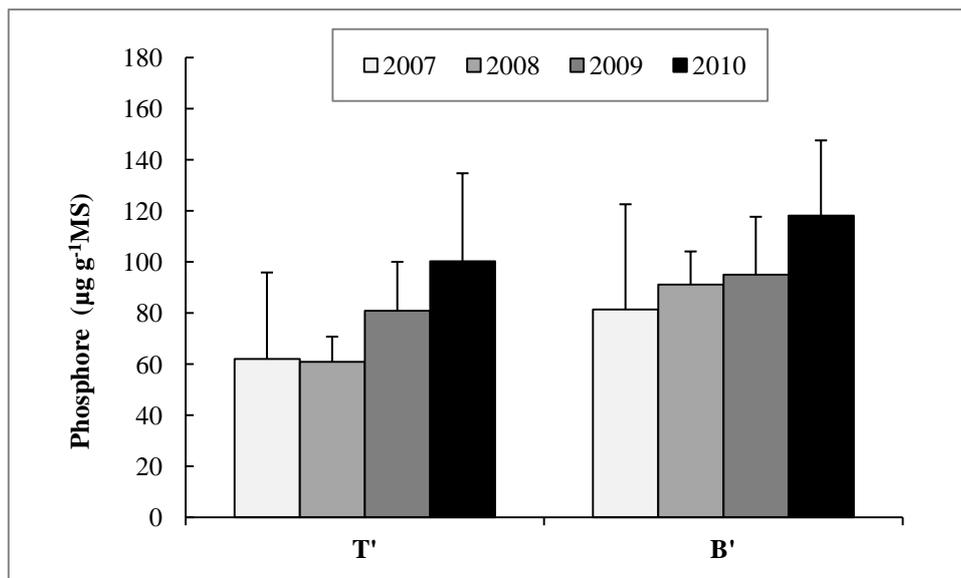


Figure 79 : Variations des teneurs en phosphore ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$) dans des cernes mis en place de 2007 à 2010 par les mélèzes amendés (B') et non amendés (T'). Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

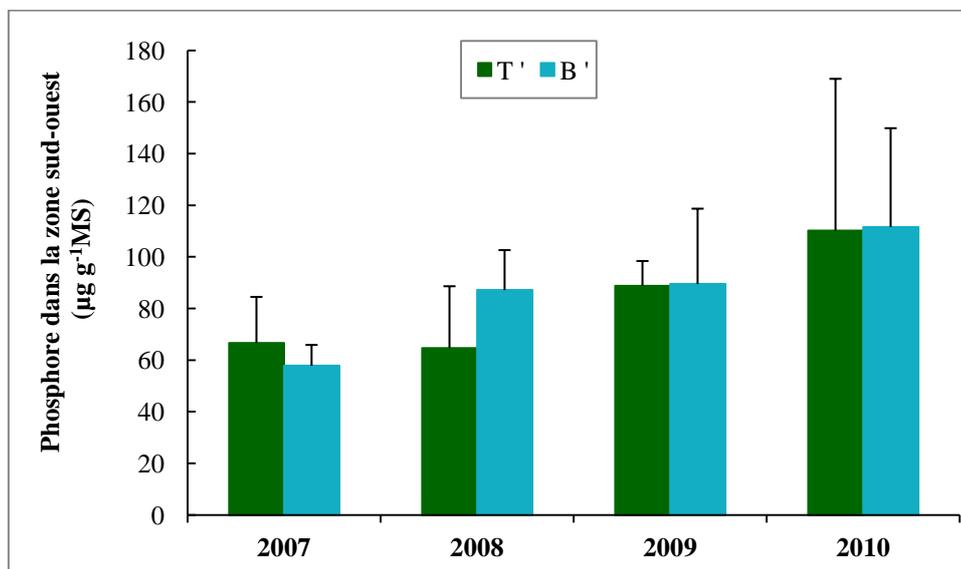


Figure 80 : Variations des teneurs en phosphore ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$) dans des cernes mis en place de 2007 à 2010 par les mélèzes amendés (B') et non amendés (T') de la zone sud-ouest définie comme homogène. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

2.2. LE SOUS-BOIS

Les résultats des relevés floristiques réalisés en 2008, 2009 et 2010 dans les parcelles amendées (B) et non amendées (T) sont présentés ci-dessous (**Tableaux 20, 21 et 22**). La **Figure 81** montre l'évolution de la richesse spécifique calculée en fonction de ces données pour les trois années.

Tableau 20 : Fiche du relevé floristique réalisé en été 2008 ; 0 à 5 : classes d'abondance-dominance (0 : Espèce rare ou ne dépassant pas 10 individus dans la placette ; 1: Espèce représentant un recouvrement de 1 à 5 % de la strate herbacée ; 2: Espèce représentant un recouvrement de 5 à 25 % de la strate herbacée ; 3: Espèce représentant un recouvrement de 25 à 50% de la strate herbacée ; 4: Espèce représentant un recouvrement de 50 à 75 % de la strate herbacée ; 5: Espèce représentant un recouvrement supérieur à 75 % de la strate herbacée).

Espèces	Modalités						Présence (1) Absence (0)		similarité
	B1	T1	B2	T2	B3	T3	T	B	
<i>Rubus fruticosus aggr.</i>	3	4	4	5	3	4	1	1	1
<i>Molinia coerulea</i>	2	2	2	2	2	2	1	1	1
<i>Hypericum humifusum et H. pulchrum</i>	2	1	0	1	2	3	1	1	1
<i>Eupatorium cannabinum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Salix caprea</i>	1	-	1	-	1	-	0	1	0
<i>Melampyrum pratense</i>	2	1	0	1	2	3	1	1	1
<i>Lathyrus pratensis</i>	2	2	2	2	2	2	1	1	1
<i>Agrostis capillaris</i>	5	5	5	5	5	5	1	1	1
<i>Deschampsia flexuosa</i>	5	4	3	2	1	0	1	1	1
<i>Lonicera periclymenum</i>	2	1	-	1	2	3	1	1	1
<i>Holcus lanatus</i>	1	1	-	2	3	-	1	1	1
<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	-	-	1	2	-	1	1	1
<i>Glechoma hederacea</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Juncus effusus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Heracleum sp.</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Carex pairae et C. pilulifera</i>	1	1	1	1	2	-	1	1	1
<i>Fraxinus exelsior</i>	1	-	-	1	1	-	1	1	1
<i>Crataegus sp.</i>	1	1	1	1	1	-	1	1	1
<i>Trifolium sp.</i>	1	-	1	-	-	-	0	1	0

Tableau 21 : Fiche du relevé floristique réalisé en été 2009 ; 0 à 5 : classes d'abondance-dominance (0 : Espèce rare ou ne dépassant pas 10 individus dans la placette ; 1: Espèce représentant un recouvrement de 1 à 5 % de la strate herbacée ; 2: Espèce représentant un recouvrement de 5 à 25 % de la strate herbacée ; 3: Espèce représentant un recouvrement de 25 à 50% de la strate herbacée ; 4: Espèce représentant un recouvrement de 50 à 75 % de la strate herbacée ; 5: Espèce représentant un recouvrement supérieur à 75 % de la strate herbacée).

Espèces	Modalités						Présence (1) Absence (0)		similarité
	B1	T1	B2	T2	B3	T3	T	B	
<i>Rubus fruticosus aggr.</i>	3	4	4	5	3	4	1	1	1
<i>Molinia coerulea</i>	2	2	2	2	2	2	1	1	1
<i>Hypericum humifusum et H. pulchrum</i>	2	1	0	1	2	3	1	1	1
<i>Eupatorium cannabinum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Salix caprea</i>	1	-	1	-	1	-	0	1	0
<i>Melampyrum pratense</i>	2	1	0	1	2	3	1	1	1
<i>Lathyrus pratensis</i>	2	2	2	2	2	2	1	1	1
<i>Agrostis capillaris</i>	5	5	5	5	5	5	1	1	1
<i>Deschampsia flexuosa</i>	5	4	3	2	1	0	1	1	1
<i>Lonicera periclymenum</i>	2	1	0	1	2	3	1	1	1
<i>Galeopsis tetrahit</i>	1	0	1	2	3	4	1	1	1
<i>Holcus lanatus</i>	1	0	1	2	3	4	1	1	1
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glechoma hederacea</i>	3	4	5	5	5	5	1	1	1
<i>Juncus effusus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Heracleum sp.</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Carex pairae et C. pilulifera</i>	1	1	2	-	-	-	1	1	1
<i>Fraxinus exelsior</i>	1	1	1	-	-	-	1	1	1
<i>Crataegus sp.</i>	1	1	1	-	-	-	1	1	1
<i>Trifolium sp.</i>	1	-	-	-	-	-	0	1	0

Tableau 22 : Fiche du relevé floristique réalisé en été 2010 ; 0 à 5 : classes d'abondance-dominance (0 : Espèce rare ou ne dépassant pas 10 individus dans la placette ; 1: Espèce représentant un recouvrement de 1 à 5 % de la strate herbacée ; 2: Espèce représentant un recouvrement de 5 à 25 % de la strate herbacée ; 3: Espèce représentant un recouvrement de 25 à 50% de la strate herbacée ; 4: Espèce représentant un recouvrement de 50 à 75 % de la strate herbacée ; 5: Espèce représentant un recouvrement supérieur à 75 % de la strate herbacée).

Espèces	Modalités						Présence (1) Absence (0)		similarité
	B1	T1	B2	T2	B3	T3	T	B	
<i>Rubus fruticosus aggr.</i>	3	4	4	5	3	4	1	1	1
<i>Molinia caerulea</i>	2	2	2	2	2	2	1	1	1
<i>Hypericum humifusum et H. pulchrum</i>	2	1	-	1	2	3	1	1	1
<i>Eupatorium cannabinum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Salix caprea</i>	0	1	1	-	1	0	1	1	1
<i>Melampyrum pratense</i>	2	1	0	1	2	3	1	1	1
<i>Lathyrus pratensis</i>	2	2	2	2	2	2	1	1	1
<i>Agrostis capillaris</i>	3	3	4	4	3	4	1	1	1
<i>Deschampsia flexuosa</i>	5	4	3	2	1	0	1	1	1
<i>Lonicera periclymenum</i>	2	1	-	1	2	3	1	1	1
<i>Galeopsis tetrahit</i>	1	0	1	2	3	4	1	1	1
<i>Holcus lanatus</i>	1	0	1	2	3	4	1	1	1
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glechoma hederacea</i>	3	4	3	5	4	4	1	1	1
<i>Juncus effusus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Heracleum sp.</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Carex pairae et C. pilulifera</i>	1	1	1	0	0	0	1	1	1
<i>Fraxinus exelsior</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Crataegus sp.</i>	1	1	1	-	1	1	1	1	1
<i>Trifolium sp.</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1

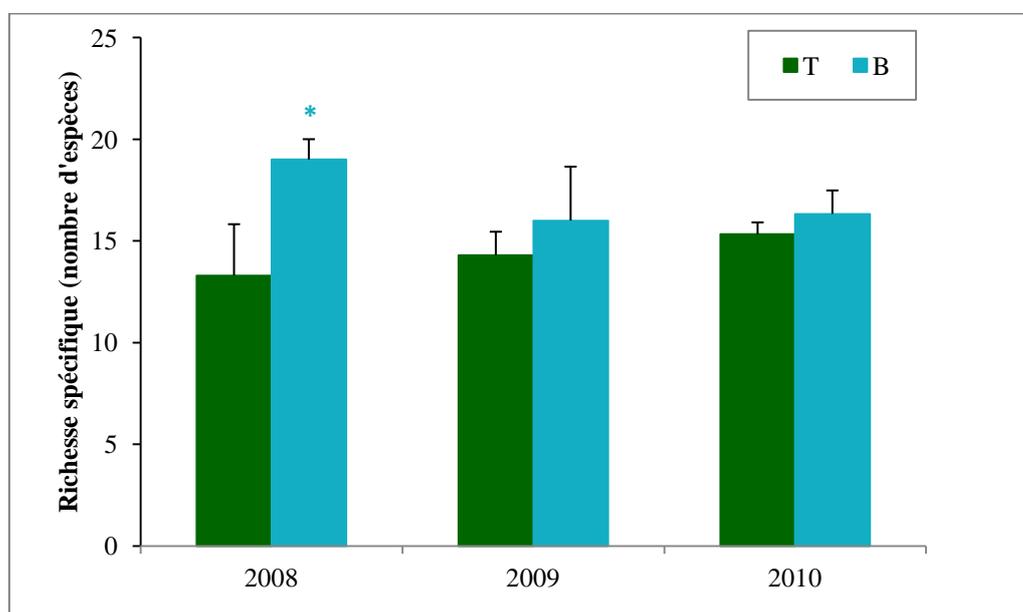


Figure 81 : Variations de la richesse spécifique dans les parcelles amendées avec l'apport de 0,4 t MS de boues liquides (B) et dans les parcelles témoins non amendées (T). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3) ; Différence significative avec le témoin à *p<0,05.

Les espèces les plus représentées au niveau du sous-bois sont : l'agrostis commun (*Agrostis capillaris*), la ronce des bois (*Rubus fruticosus aggr.*), la molinie bleue (*Molinia caerulea*) et la gesse des près (*Lathyrus pratensis*). Les relevés floristiques réalisés lors de la première année après épandage montrent une augmentation significative de la richesse spécifique des parcelles amendées (B) comparées aux témoins (T), tandis qu'en 2009 et 2010,

aucune différence significative n'a été observée. Bien que la richesse spécifique des placettes (B) a été améliorée 2008, l'indice de similitude Sorensen entre les deux traitements B et T est égale à 94,7 contre 88,2 et 97,14 % respectivement en 2009 et 2010.

Un relevé floristique a été réalisé également au niveau des 10 sous-placettes (SP) amendées deux fois 3t MS ha⁻¹. Les résultats obtenus sont présentés dans les **Tableaux 23 et 24** :

Tableau 23 : Fiche du relevé floristique réalisé en été 2010 dans les SP B' et T' :

Eté 2010	Nombre d'individus par SP										Présence (1) Absence (0)		Similarité
	B'1	T'1	B'2	T'2	B'3	T'3	B'4	T'4	B'5	T'5	T'	B'	
<i>Agrostis capillaris</i>	-	2	2	-	-	6	-	-	1	9	1	1	1
<i>Betula pubescens</i>	-	2	-	-	-	-	1	-	-	2	1	1	1
<i>Carex pilulifera</i>	4	18	16	15	19	7	31	1	11	7	1	1	1
<i>carpinus betulus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0	1	0
<i>Deschampsia flexuosa</i>	-	1	-	16	-	-	7	-	35	1	1	1	1
<i>Digitalis purpurea</i>	-	-	3	-	1	-	-	-	-	-	0	1	0
<i>Frangula alnus</i>	-	-	-	-	1	1	2	4	3	1	1	1	1
<i>Galeopsis tetrahit</i>	-	2	1	-	-	-	1	-	-	-	1	1	1
<i>Holcus lanatus</i>	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	1	1	1
<i>Hypericum humifusum</i>	1	-	1	1	3	-	-	-	1	-	1	1	1
<i>Hypericum pulchrum</i>	-	1	2	-	1	-	1	-	-	2	1	1	1
<i>Juncus tenuis</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0	1	0
<i>Lonicera periclymenum</i>	10	18	9	-	8	9	-	2	1	1	1	1	1
<i>Luzula sylvatica</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	2	-	0	1	0
<i>Pteridium aquilinum</i>	14	20	18	6	18	8	5	6	19	4	1	1	1
<i>Quercus robur</i>	3	4	-	9	21	-	3	18	16	10	1	1	1
<i>Rubus fruticosus aggr.</i>	4	4	1	7	6	17	20	2	-	8	1	1	1
<i>Teucrium scorodonia</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0
<i>Spiraea ulmaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	0	1	0

Tableau 24 : Abondance relative de chaque espèce présente sur les SP en % :

Espèces observées	SDC* (B')	SDC* (T')	AR% (B')	AR***% (T')
<i>Agrostis capillaris</i>	3	17	0,51	2,88
<i>Betula pubescens</i>	1	4	0,17	0,68
<i>Carex pilulifera</i>	81	48	13,73	8,14
<i>Carpinus betulus</i>	1	0	0,17	0
<i>Deschampsia flexuosa</i>	42	18	7,12	3,05
<i>Digitalis purpurea</i>	4	0	0,68	0
<i>Frangula alnus</i>	6	6	1,02	1,02
<i>Galeopsis tetrahit</i>	2	2	0,34	0,34
<i>Holcus lanatus</i>	2	2	0,34	0,34
<i>Hypericum humifusum</i>	6	1	1,02	0,17
<i>Hypericum pulchrum</i>	4	3	0,68	0,51
<i>Juncus tenuis</i>	1	0	0,17	0
<i>Lonicera periclymenum</i>	28	30	4,75	5,08
<i>Luzula sylvatica</i>	3	0	0,51	0
<i>Pteridium aquilinum</i>	74	44	12,54	7,46
<i>Quercus robur</i>	43	41	7,29	6,95
<i>Rubus fruticosus aggr.</i>	31	38	5,25	6,44
<i>Teucrium scorodonia</i>	1	0	0,17	0
<i>Spiraea ulmaria</i>	3	0	0,51	0
Nombre d'espèces	336	254	56,95	43,05
Richesse spécifique (19)	19	13		

*SDC : Somme Des Contributions

**AR% : Abondance Relative de l'espèce

On constate qu'après deux applications de 3 t MS de boues par hectare (juillet 2009 et mars 2010), le nombre total d'espèces dans les SP (B') augmente de 46% par rapport aux SP témoins (T'). Cependant, l'abondance relative de ces espèces présentes uniquement dans les SP (B') reste inférieure à 1. Une légère augmentation de la biomasse du sous-bois dans les parcelles amendées a été notée en 2008. Cependant, la différence n'est pas significative et les valeurs moyennes sont 1,5 t ha⁻¹ et 1,7 t ha⁻¹ de matière sèche respectivement dans les parcelles T et B.

2.3. LES TRANSFERTS SOL-PLANTE

Les aiguilles des arbres bordant les sous-placettes amendées par les boues en 2008, 2009 et 2010 (B') et celles non amendées (T') ont fait l'objet d'un prélèvement au printemps 2010. L'examen des résultats obtenus concernant les teneurs en azote ne montre aucune différence entre les sous-placettes témoins et celles amendées (**Figure 82**).

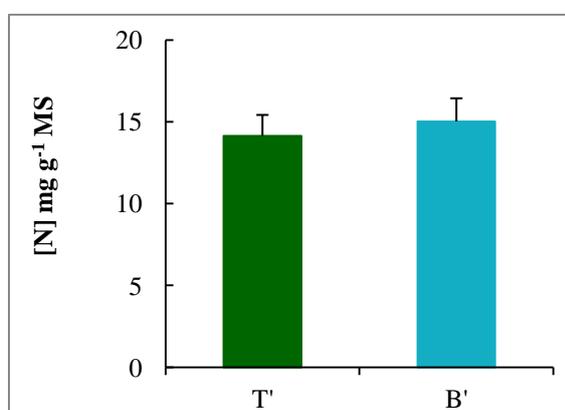


Figure 82 : Variations des teneurs en azote (mg g⁻¹ MS) des aiguilles de mélèze *Larix decidua* témoin (T') et amendé (B') par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=12).

Les teneurs en éléments minéraux (**Figure 83**) et en éléments traces (**Figures 84**) mesurées dans des aiguilles des arbres B' ne montrent aucune différence significative comparées à celles des arbres témoins (T'). Les teneurs en zinc sont largement supérieures à celles du cuivre et du plomb. Les teneurs en cadmium quand à elles sont très faibles de l'ordre de 0,21 µg g⁻¹ MS.

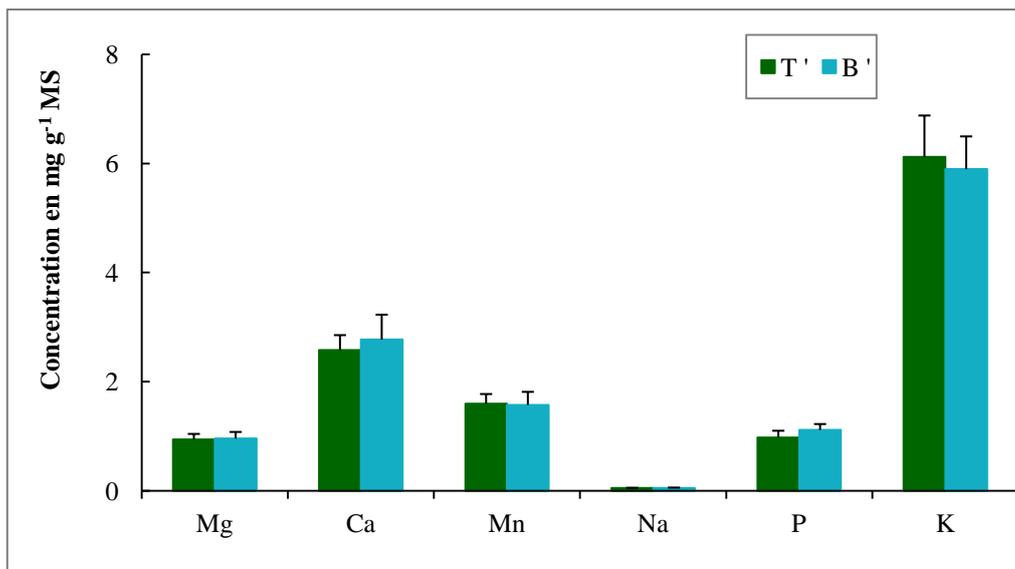


Figure 83 : Variations des teneurs en EM (P, K, Mg, Mn, Ca et Na), exprimées en mg g^{-1} MS, des aiguilles de mélèze *Larix decidua* témoin (T') et amendé (B') par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=12).

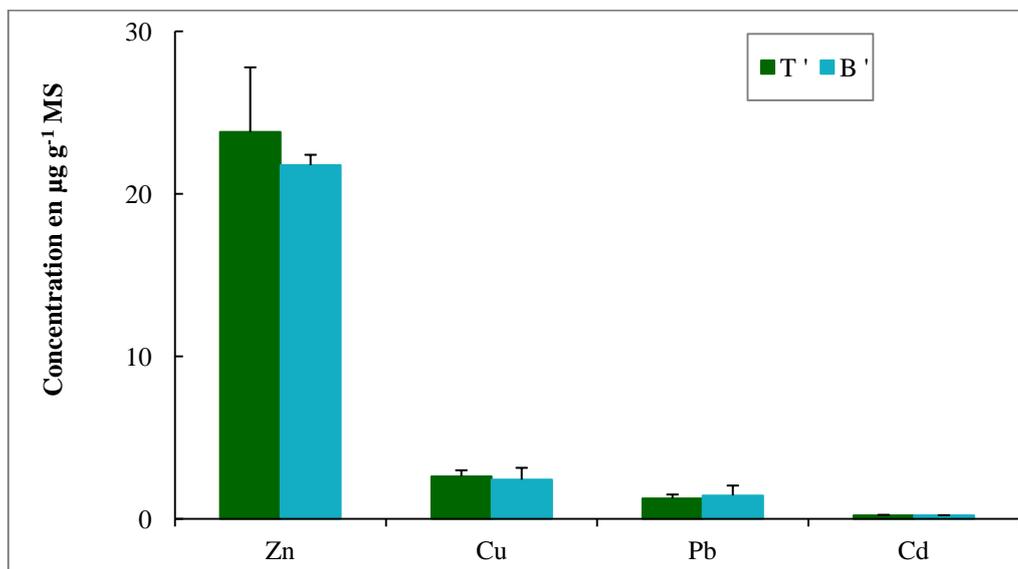


Figure 84 : Variations des teneurs en ETM (Cu, Zn, Pb et Cd), exprimées en $\mu\text{g g}^{-1}$ MS, des aiguilles de mélèze *Larix decidua* témoin (T') et amendé (B') par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=12).

2.4. LES TRANSFERTS SOL-CHAMPIGNONS

Les champignons constituent des organismes dont la cueillette est régulière en période automnale. Dans le but d'évaluer la capacité de la bioaccumulation des EM et surtout des ETM dans les champignons, un échantillonnage de l'ensemble des carpophores a été réalisé en automne 2010 dans les placettes amendées en juin 2008 ($0,4 \text{ t MS ha}^{-1}$) (B) et les placettes témoins (T). Sur le site de Mélisey, un panneau informatif a été mis en place afin de prévenir les promeneurs de l'expérimentation en cours et que la récolte des champignons était interdite. La mairie avait relayé ce message auprès des habitants concernés. Les teneurs présentes dans les échantillons prélevés au niveau des placettes B et T ne montrent aucune

différence significative et ce quel que soit l'élément étudié (**Figures 85 et 86**). Le phosphore et surtout le potassium présentent les plus fortes concentrations en EM. Concernant les ETM, c'est le zinc d'abord puis le cuivre qui montrent des valeurs importantes et supérieures à $20 \mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$.

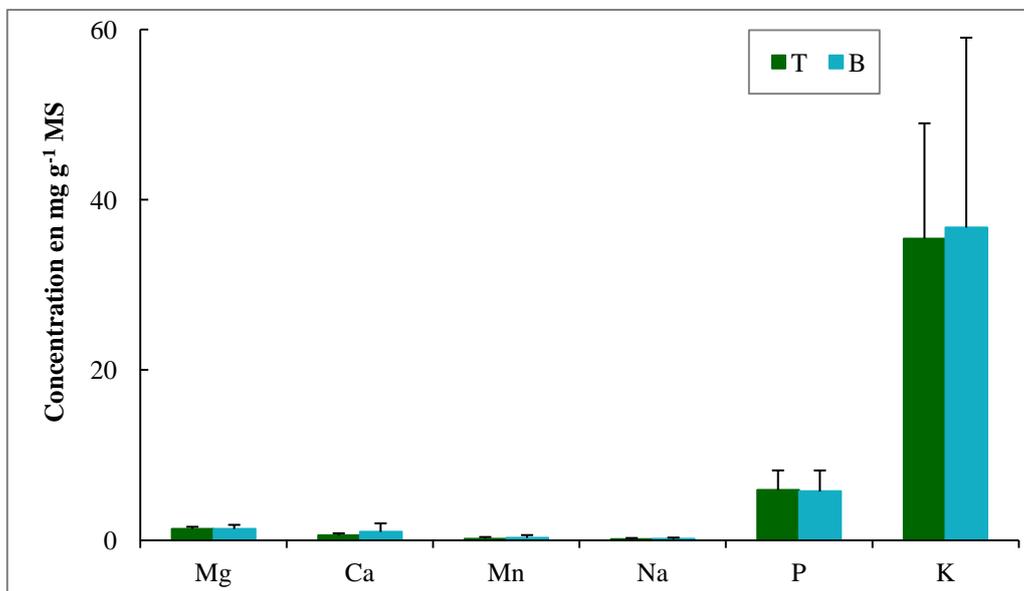


Figure 85 : Variations des teneurs en EM (P, K, Mg, Mn, Ca et Na), exprimées en $\text{mg g}^{-1}\text{MS}$, des carphores récoltés dans les placettes témoins (T) et amendées (B) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types ($n=10$).

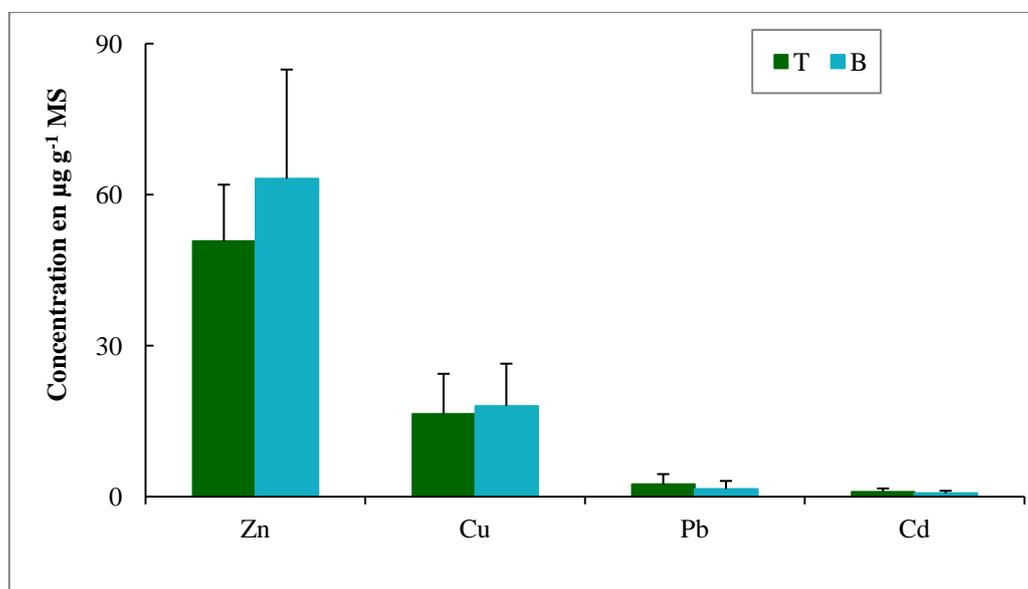


Figure 86 : Variations des teneurs en ETM (Cu, Zn, Pb et Cd), exprimées en $\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$, des carphores récoltés dans les placettes témoins (T) et amendées (B) par des boues de STEP. Les barres d'erreur représentent les écarts-types ($n=10$).

3. DISCUSSION

3.1. LA CROISSANCE ET LE STATUT NUTRITIONNEL

L'application des boues n'engendre aucune toxicité pour les plants de mélèze qui ont manifesté un taux de reprise supérieur à 98%. Les résultats obtenus au cours de notre étude en **conditions contrôlées** ont montré une meilleure croissance en hauteur à partir du 7^{ème} mois après l'apport des boues. À 18 mois de culture, les plants fertilisés avec 30 ou 60 t MS ha⁻¹ sont respectivement 47,9 % et 66,2 % plus haut, 30,4 % et 35,1 % plus gros au niveau du collet comparés aux plants témoins. Ainsi, l'activité du méristème apicale a été la plus favorisée lors de notre étude. **Benbrahim et al. (2003)** ont montré que des apports réguliers de boues liquides (3 t MS ha⁻¹ an⁻¹) ont augmenté la croissance de 16 % en hauteur et de 22 % en diamètre du tronc des Pins maritimes au cours de la troisième année. Les travaux de **Fuentes et al. (2007)** ont montré que la croissance des Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) en hauteur et en diamètre a augmenté après l'apport de 14,5 kg MS des boues par plant (22 et 23 % respectivement), tandis que la hauteur des chênes (*Quercus ilex*) n'a pas été affecté. Une expérience avec des semis de mélèze laricin (*Larix laricina*) a permis d'observer, après 4 mois de culture, des hauteurs et des diamètres atteignant 300 et 210 % supérieurs à ceux des témoins respectivement. Les apports de boues vont de 0,6 à 10,9 Mg ha⁻¹ MS (**Couillard, 1989**). D'autres auteurs (**Tsakou et al., 2003**) ont également observé un effet similaire sur la croissance en hauteur et le grossissement du collet chez des jeunes Peupliers après épandage de boues. Cependant, la combinaison entre épandage de boues et arrosage avec l'effluent en sortie de STEP a un effet négatif sur la croissance de ces peupliers. Les auteurs ont attribué cette inhibition à l'augmentation du pH du sol amendé qui réduirait la biodisponibilité des éléments minéraux dans le sol. L'augmentation de la production chez le mélèze s'expliquerait par à l'amélioration de la qualité de la nutrition minérale surtout celle des facteurs limitant la productivité en écosystème forestier à savoir l'azote et le phosphore. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Benbrahim et al (2003)** qui ont montré une augmentation des teneurs en phosphates dans les aiguilles de Pins maritime après amendement. La production de biomasse sèche n'augmente significativement que 12 mois après épandage, ainsi, la biomasse produite a été multipliée par 3 avec l'apport de 60 t MS ha⁻¹. Des effets similaires (1,8 fois) ont été observés après cinq mois de culture sur des semis de Pin d'Alep fertilisés par les boues (14,5 kg MS par plant) (**Fuentes et al. (2007)**). A 18 mois de culture, le ratio de la masse racinaire à la masse totale n'a montré aucun effet des boues sur la distribution de la biomasse entre la partie aérienne et racinaire, tandis que **Labrecque et al. (1995)** a montré une distribution de la biomasse favorisant parties aériennes des Saules. Ces auteurs ont attribué cet effet à la disponibilité des nutriments. Au cours de ce travail, l'effet bénéfique des boues sur l'accumulation de biomasse n'a été enregistré que 12 mois après épandage. Comme la croissance en hauteur a été significative dès le 7^{ème} mois, et que les taux de croissance relatifs étaient plus élevés entre (0 -3 mois) et (1,5 - 6 mois), il est probable que l'effet sur l'accumulation de biomasse est devenu significatif peu de temps après la récolte de 6 mois. Cette réponse différée s'explique probablement, d'abord par le temps nécessaire à la minéralisation de la MO apportée, qui améliore le statut nutritionnel puis l'activité photosynthétique des jeunes semis.

Contrairement aux résultats obtenus en conditions contrôlées, aucune différence significative entre les traitements n'a été observée *in situ*. Cependant, les mesures dendrométriques effectuées sur le peuplement de mélèzes ont révélée l'hétérogénéité de la parcelle. En effet, les hauteurs et les circonférences sont très variables sur le site d'étude. Toutefois, les droites qui représentent le rapport entre la circonférence et la hauteur montrent que les tendances de croissance des arbres ne varient pas en fonction du traitement. Les surfaces terrières ainsi que les données pédologiques ont permis de définir des zones homogènes de croissance du peuplement. Ainsi, la cartographie établie montre une meilleure croissance sur les zones à sols profonds. **Riou-Nivert (2001)** a montré que la croissance des mélèzes est optimale sur des sols profonds et fertiles. Les besoins nutritifs sont élevés en général et en particulier en K et Mg (**USDA, 2008**). Nos résultats montrent également un peuplement clairsemé localisé en haut de la parcelle. Cette zone est caractérisé par un sol très hydromorphe avec une nappe temporaire située à 80 cm de profondeur. En effet, les mélèzes sont très sensibles à l'asphyxie des racines (**Riou-Nivert, 2001**), ce qui expliquerait la forte mortalité des semis observée. Ainsi, cette approche permet de s'affranchir de l'influence des facteurs du milieu sur les paramètres de croissance et de pouvoir ainsi mieux isoler un effet éventuel de l'amendement. Malgré la définition de ces zones, aucun effet du traitement n'a été détecté. Ainsi, ce résultat pourrait être attribué à la dose trop faible épandue (0,4 t MS ha⁻¹). **Couillard et Grenier (1989)** ont étudié l'effet de différents apports de boues sur la croissance des mélèzes *Larix laricina*. Ces auteurs ont conclu que l'absence d'effet est le résultat d'un des deux facteurs : un apport trop faible de boues ou bien un taux de minéralisation très bas lors de l'application de doses importantes. Ainsi, l'ensemble des paramètres analysés ne manifeste aucun effet lié à l'épandage de 0,4 t MS de boues. Cependant, la richesse spécifique du sous-bois a augmenté significativement lors de la 1^{ère} année après épandage. Des apports importants et réguliers (3 t MS ha⁻¹ an⁻¹) ont accentué cette augmentation. Des résultats similaires ont été obtenus par **Carnus et al. (2007)**. Ces auteurs ont noté, durant la 3^{ème} année, une diminution de la richesse spécifique qui ne traduit pas un retour vers un état initial, mais un changement dans la flore du sous-bois. Il s'agit d'un phénomène bien connu en phyto-écologie avec une prolifération des espèces consécutive à une fertilisation ou un amendement, puis une diminution de la richesse spécifique du fait de la compétition entre espèces : certaines sont plus compétitives et prolifèrent, pendant que d'autres disparaissent.

Une attention particulière a été accordée aux effets des boues sur l'accumulation des ETM par les champignons. Nos résultats n'ont montré aucun effet significatif, tandis que **Carnus et al. (2007)** ont montré que les boues liquides ont augmenté significativement les concentrations du Cu dans deux espèces de champignons (*Hygrophoropsis aurantiaca* et *Xerocomus badius*) et que les boues compostées et les boues déshydratées chaulées ont augmenté la teneur en Zn dans *Laccaria laccata* et *Mycena epipterygia* respectivement. Ces boues ont été épandues à raison de 3 t MS ha⁻¹ an⁻¹. Ainsi, les résultats de ces auteurs confirment que les concentrations des ETM dans les champignons dépendent de l'espèce et de l'élément considéré (**Kalač et Svoboda, 2000**).

Compte tenu de l'absence d'effets notables des boues sur les mélèzes *in situ*, seuls les résultats en **conditions contrôlées** seront discutés ci-dessous. Déjà souligné dans le **Chapitre I**, l'apport de boues liquides a augmenté significativement les teneurs en N et en P des horizons supérieurs du sol, ce qui augmenterait la disponibilité de ces éléments pour les

jeunes semis de mélèze. En effet, les teneurs en N assimilées par les plants de mélèze augmentent avec l'apport des boues. A 12 mois de culture par exemple, les teneurs moyennes en % N ont été supérieures de 34 % et 78 % dans les aiguilles et 44 % et 62 % dans les racines latérales respectivement avec l'apport de 30 et 60 t MS ha⁻¹ comparé aux plants témoins sans apport de boues. Cette augmentation des teneurs en N a été observée par plusieurs auteurs. **Bramryd (2001)** a rapporté que les teneurs en N ont augmenté dans les aiguilles du Pin sylvestre 3 ans après l'apport de 20 t MS ha⁻¹ de boues. **Labercque et al. (1995)** ont observé également une augmentation de la teneur en N des saules amendés quel que soit l'apport de boues (40, 80, 120, 160 et 200 kg d'azote disponible par hectare).

Les concentrations foliaires en N chez *Larix decidua* sont optimales entre 2,0 et 2,3 % (**Bonneau, 1988**). Ainsi, les plants témoins sont déficients en N, puisque les teneurs moyennes présentes sont 1,21 et 1,47 respectivement à 3 et à 6 mois de culture. Toutefois, les concentrations ont augmenté pour atteindre l'optimum à 12 mois de culture (2,05 %). Contrairement aux plants témoins, les plants B1 ont des teneurs optimales dès 3 mois de culture (2,04 %), tandis que les plants B2 ont montré une assimilation largement supérieure à l'optimum (2,62 %). Ceci est confirmé par l'examen visuel des aiguilles des plants qui montre un fort jaunissement chez les témoins comparés aux plants fertilisés par les boues (**Figure 87**).



Figure 87 : Les plants de mélèzes *Larix decidua* à 3 mois de culture sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha⁻¹ et B2: 60 t MS ha⁻¹) par des boues de STEP.

Cette amélioration de la nutrition azotée s'explique par la libération de l'azote contenu dans les boues. Il est à noter que l'effet « dose » est remarquable uniquement au niveau de la teneur des aiguilles en azote. Ainsi, une dose de 30 t MS ha⁻¹ de boues pourrait être suffisante pour combler les besoins du mélèze en azote. En effet, l'azote apporté lors de l'application de 60 t MS ha⁻¹ est assimilé d'une manière excédentaire par cette espèce. Toutefois, il est très important de tenir compte de la charge en azote des doses épandues qui pourrait présenter un risque de contamination de la nappe par lessivage des nitrates (**Chapitre II**).

L'étude des contributions des différentes sources d'azote, fournies par les boues, pour l'alimentation de la plante s'avère indispensable. Il est connu que les composés organiques en particulier les acides-aminés, mais aussi les petits peptides peuvent être absorbés par les plantes (**Rentsch et al. 2007**). Cette hypothèse est tout à fait possible puisque les boues sont riches en azote organique. Une autre forme d'azote fournie par les boues est l'ammoniac. Cette forme a l'avantage d'être assimilés plus facilement que NO_3^- ou les composés organiques en raison du faible coût énergétique pour la cellule. Néanmoins, il est toxique et son assimilation dépend des espèces (**Nicodème et al. 2008**). Toutefois, les gymnospermes, comme le mélèze, assimilent préférentiellement NH_4^+ (**Malagoli et al., 2000 ; Cui et Song, 2007 ; Aarnes et al. 2007**). Cette hypothèse a été étayée par l'examen de l'activité de la NR. Nos résultats ont révélé, à un mois et demi de culture, que l'activité de la NR est plus élevée dans les aiguilles que dans les racines. Cités par **Malagoli et al. (2000), Margolis et al. (1988)** et **Seith et al. (1994)** ont souligné que chez la plupart des espèces forestières, l'activité de la NR est principalement située dans les racines que dans les aiguilles. Par contre, les travaux de **Malagoli et al. (2000)** n'ont montré aucune différence significative entre les deux compartiments chez le mélèze. L'apport des boues réduit l'activité de cet enzyme dans les deux organes étudiés (A1 et R1). En effet, l'ajout de NH_4^+ peut provoquer une diminution de l'activité NR (**Orebamjo et Stewart, 1975**), en particulier chez les plantes assimilant préférentiellement cette forme. Cependant, cette diminution n'est pas systématique. **Mohanty et Fletcher (1976)** ont signalé que l'efficacité de la NR est plus importante dans le cas d'une nutrition azotée mixte : NH_4^+ et NO_3^- . Néanmoins, la diminution de l'assimilation des NO_3^- observée pourrait être liée à une augmentation de la quantité de NH_4^+ fournie par les boues. En effet, l'ammonium est la forme prédominante de l'azote minéral contenue dans les boues liquides et les ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) ne sont présents qu'à des très faibles quantités (143 et 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS respectivement).

Contrairement à l'azote, le phosphore présent dans les boues est majoritairement inorganique (**Frossard et al. 1994, Singh et Agrawal 2008**). Cependant, seule une fraction très faible est biodisponible pour les plantes (**Khanna et al. 2007**). Cette fraction est déterminée par la méthode de dosage Olsen. En effet, dans le cas du sol de Mélisey, la fraction du P biodisponible n'est que de 1,1% de la teneur total en phosphore. Sa concentration est de 6,64 mg g^{-1} MS, ce qui place ce sol dans la catégorie des sols très pauvres. Dans les boues utilisées lors de ces expérimentations, la fraction Olsen représente 3,94% du P total mesuré. Ces données sont cohérentes avec celles présentées par **Smith et al. (2006)**. L'effet des boues sur les teneurs totales en phosphore dans les organes des plants de mélèze s'est révélé d'une manière remarquable après 18 mois de culture. A ce stade, la moyenne de l'assimilation nette du P a augmenté de 110 mg plant^{-1} chez le témoin à 155,9 mg plant^{-1} et 250,5 mg plant^{-1} respectivement après l'apport de 30 ou 60 t MS ha^{-1} de boues. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Munir et Bayan (2004)**. Ces auteurs ont observé une augmentation de la teneur en P chez la laitue de 79,2 mg plant^{-1} à 577,8 mg plant^{-1} lors d'un apport de boue de 80 t MS ha^{-1} . Les teneurs foliaires en P soulignent l'état nutritionnel de la plante vis-à-vis de cet élément. A 3 mois de culture, le taux moyen de P était 0,05 % dans les aiguilles des plants témoins et 0,1 et 0,07 % pour les plants amendés (30 ou 60 t MS ha^{-1} de boues respectivement). Ces valeurs révèlent une carence en P compte tenu des teneurs optimales qui vont de 0,22 % à 0,30 % (**Bonneau, 1988**). Au contraire, les valeurs

enregistrées après 18 mois de culture montrent une nutrition phosphatée optimale (0,27 %) pour les plants témoins et une assimilation de luxe pour les plants amendés (0,39 et 0,41 pour B1 et B2 respectivement). Des résultats similaires ont été décrits par **Egiarte et al. (2005)**. Ces auteurs ont montré que la concentration moyenne en P dans les aiguilles de pin de Monterey (*Pinus radiata* D. Don) est passée de 0,3 % chez le témoin sans boues à 0,4 % quelle que soit la dose de boues apportée. Ainsi, l'amélioration de la nutrition phosphatée des mélèzes n'est pas immédiate et n'apparaît que la deuxième année après épandage. Les travaux de **Benbrahim et al. (2003)** ont montré cet effet pendant la troisième année suite à des épandages annuels de 3 t MS ha⁻¹ de boues liquides. Ce résultat pourrait s'expliquer par une forte rétention du P inorganique par les constituants du sol (**Chapitre II**).

Concernant le K, l'amélioration de la nutrition potassique en présence des boues n'est révélée qu'à 12 mois de culture. En effet, les taux de K étaient 0,74 ; 0,81 et 1,28 % dans les aiguilles des plants témoins et amendés B1 et B2 respectivement. Un effet comparable a été observé également chez le Paspale distique (*Paspalum distichum*) par **Bhattacharya et al. (2010)**. Nos résultats ne sont pas en accord à ceux obtenus par **Miah et al. (1999)** qui ont mentionné la faible capacité fertilisante des boues en matière de nutrition potassique. Il est connu que les boues n'apportent que très peu de K par rapport au stock initialement présent dans le sol (1 à 2 %) (**Benbrahim et al., 2003**) et leur apport n'a engendré aucun enrichissement du sol (**Chapitre I**). Par conséquent, l'augmentation de la concentration du K en présence des boues s'expliquerait par un effet indirect des boues sur le K du sol qui se traduit par une augmentation de la biodisponibilité de cet élément pour la plante. Cet effet a été constaté notamment sur les autres éléments minéraux (Mg, Ca, Mn et Na) et sera ultérieurement discuté. Selon **Couillard et Grenier (1989)**, l'amélioration de la nutrition potassique dépend du type de sol. En effet, ces auteurs ont montré que les concentrations de K dans le mélèze laricin (*Larix laricina*), cultivé pendant 4 mois sur un sol de pépinière et fertilisé avec l'équivalent de 125 kg N ha⁻¹ de boues, étaient supérieures aux concentrations optimales (0,7 à 0,8 %) décrites par **Bonneau (1988)**. Par contre, les valeurs enregistrées ont été inférieures à l'optimum sur un sol sableux sous les mêmes conditions. Contrairement à l'N et P, les concentrations foliaires du K ont évolué différemment. À 3 mois de culture, les plants n'ont montré aucune carence potassique. En revanche, les concentrations foliaires ont diminué à 6 mois de culture et les valeurs moyennes étaient inférieures aux concentrations optimales. Cette chute s'expliquerait probablement par la dilution du K assimilé dans la biomasse produite. En effet, le taux de croissance relatif (RGR) a été plus élevé entre 1,5 et 6 mois de culture. Cette carence a été levée lors des récoltes de 12 et 18 mois quel que soit le traitement.

Le potassium est absorbé par les plantes sous la forme ionique (K⁺), très mobile, dissout dans le liquide intracellulaire, notamment la vacuole, où il s'accumule à des concentrations jusqu'à trois cents fois supérieures à celles du milieu environnant. Son abondance et sa mobilité en font le cation le plus important pour la création de la pression osmotique et donc de la turgescence vacuolaire. Cependant, l'apport des boues n'a pas affecté le potentiel hydrique des plants. Ce résultat est cohérent avec celui de **Fuentes et al. (2007)** obtenu lors de l'application des boues (7,5 ou 14,5 kg MS plant⁻¹) aux plants de Pin d'Alep (*Pinus halepensis*). En plus de son influence sur le potentiel hydrique, les flux de potassium contrôlent l'ouverture et la fermeture des stomates (**Marschner, 1995**). Le pore stomatique permet aux végétaux terrestres, en plus du fonctionnement hydrique, d'acquérir le carbone

nécessaire à leur métabolisme et à leur croissance sous forme de CO₂. Il a été noté que l'apport des boues a assuré une meilleure nutrition minérale des plants de mélèze. Les répercussions de cet état nutritionnel favorable à la croissance apparaissent au niveau de l'assimilation nette de CO₂. Cette assimilation augmente significativement en fonction de la dose des boues apportée. **Mata-Gonzalez et al. (2002)** ont étudié l'impact de différents taux d'application des boues d'épuration (0, 7, 18, 34 et 90 t MS ha⁻¹) sur les échanges gazeux au cours des saisons chez le blue grama (*Bouteloua gracilis*) et tobosa (*Hilaria mutica*). Ainsi, l'application des boues au printemps a entraîné une augmentation du taux d'assimilation nette de CO₂ contrairement à un apport estival. Ces auteurs ont attribué cette augmentation de l'activité photosynthétique à une augmentation du contenu foliaire en protéines. En effet, la concentration moyenne des protéines est 6,07 dans les aiguilles des plants témoins et 6,81 et 10,85 mg g⁻¹ MF dans les aiguilles des plants fertilisés avec 30 et 60 t MS ha⁻¹ respectivement. En revanche, d'autres auteurs (**Antolín et al., 2010**) ont démontré que l'apport des boues a augmenté la Pn des plants d'Alfa Alfa sans que celui-ci affecte la teneur des feuilles en protéines. La chlorophylle intervient comme collecteur de lumière dans les antennes et comme convertisseur photochimique dans les centres réactionnels des photosystèmes. D'un point de vue physiologique, l'augmentation de l'assimilation nette de CO₂ observée est en partie due à la concentration foliaire en chlorophylle a. L'évolution de celle-ci avec l'apport des boues est positivement en accord avec l'augmentation de la Pn. Il est connu que la synthèse de la chlorophylle est très dépendante de la disponibilité en azote. Les observations de l'état des plants et leurs apparences ont été notées régulièrement au cours de la culture. Sur le sol témoin (sans boues), on a observé que les aiguilles des plants de Mélèze avaient une coloration jaunâtre (**Figure 87**) due à un déficit en chlorophylle. Les différentes campagnes de mesures (juin à septembre) ont permis de déterminer les variations de l'activité photosynthétique au cours de la saison. Les résultats obtenus ont permis de constater que la Pn reste stable en juin et juillet et diminue significativement en août et en septembre. Il est connu que le taux d'assimilation carboné par surface foliaire décroît avec le vieillissement des aiguilles et déclenche le phénomène de sénescence. Ces différences d'évolution avec l'âge peuvent être attribuées aux processus de remobilisation de l'azote qui sont fortement associés à la dégradation subséquente de la chlorophylle et des réserves protéiques (**He et Jin, 1999**) notamment la RubisCO (**Jiang et al., 1993**).

Comme le potassium, les teneurs totales du Mg, du Ca, du Mn et du Na ont augmenté avec l'apport des boues malgré leurs teneurs faibles en ces éléments minéraux. **Bramryd (2001)** a démontré que l'apport de 20 t MS ha⁻¹ de boues pâteuses (20% MS L⁻¹) a augmenté les concentrations de Ca, Na et Mg dans les aiguilles du pin sylvestre 3 ans après l'épandage. Il a été noté dans le **Chapitre I** que le sol n'a subi aucune modification des concentrations de ces éléments. **N'Dayegamiye et al. (2004)** expliquent cet effet indirect par l'amélioration de la structure et la porosité des sols permettant une meilleure aération et une forte capacité de rétention de l'eau qui se traduit par une croissance optimale des racines et une absorption élevée des éléments minéraux. Ces auteurs soulignent également l'effet des boues sur les activités biologiques et enzymatiques qui permettent la minéralisation de la matière organique et modifient les propriétés physicochimiques du sol et donc indirectement modifient l'offre en éléments minéraux biodisponibles.

3.2. LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

L'apport des boues a augmenté les teneurs en Cu, Zn, Pb et Cd dans les différents organes des plants mélèze par comparaison avec les plants témoins non amendés. Cette augmentation est plus importante lorsque la dose de boue appliquée est double, mais celle-ci n'est pas toujours significative. Plusieurs auteurs ont montré que l'épandage des boues sur les sols forestiers augmente l'accumulation des ETM dans les arbres. Ce fait a été démontré par **Vaitkutė et al. (2007)** pour le Bouleau verruqueux et le Pin sylvestre, par **Majid et al. (2012)** pour l'Acacia mangium, et par **Jama et Nowak (2012)** pour le saule. Les boues constituent un apport supplémentaire d'ETM pour le mélèze cultivé sur les sols amendés par ces boues (**Chapitre I**). Cependant, le **Tableau 25** montre que les boues ont affecté uniquement les concentrations du Cu dans les racines latérales des plants B2. Ce résultat pourrait s'expliquer d'une part, par la concentration élevée du Cu présente dans les boues épandues (843,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS), et d'autre part, par la quantité de Cu apportée lors de l'épandage de l'équivalent de 60 t MS ha^{-1} (168,8 mg de Cu par pot). Par ailleurs, les concentrations des quatre ETM dans les racines latérales dépassent les seuils minimaux de phytotoxicité définis dans la littérature (**Tableau 26**). Cependant, aucune toxicité apparente – c'est-à-dire de baisse de biomasse ou de colorations anormales – n'a été notée. Les concentrations atteintes dans les aiguilles sont considérées comme suffisantes pour le Cu et le Zn, et largement inférieures au seuil de toxicité pour le Pb et le Cd. Ainsi, l'accroissement des quantités de métaux prélevées est lié globalement à l'augmentation de la biomasse produite après apport de boues.

Tableau 25 : Concentrations des ETM (moyenne \pm écart-type) ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) dans les racines latérales et les aiguilles des plants de mélèze *Larix decidua* cultivés sur un sol forestier témoin (T) ou amendé (B1: 30 t MS ha^{-1} et B2: 60 t MS ha^{-1}) par des boues de STEP. Les lettres signalent les différences significatives entre les traitements ($p < 0,05$, test de Tukey). nd : inférieur à la limite de détection.

Organes		Cu	Zn	Pb	Cd
Racines latérales (Rl) 18 mois de culture	T	38,62 \pm 14,51 ^a	133,23 \pm 38,14 ^a	46,61 \pm 2,06 ^a	5,92 \pm 0,91 ^a
	B1	70,21 \pm 29,24 ^{ab}	132,90 \pm 31,52 ^a	55,38 \pm 5,47 ^a	4,80 \pm 1,47 ^a
	B2	89,04 \pm 20,08 ^b	177,02 \pm 39,98 ^a	42,57 \pm 8,62 ^a	3,26 \pm 1,36 ^a
Aiguilles (A1) 18 mois de culture	T	10,24 \pm 1,53 ^a	096,72 \pm 38,62 ^a	nd	0,45 \pm 0,23 ^a
	B1	12,41 \pm 3,80 ^a	129,78 \pm 24,21 ^a	nd	0,75 \pm 0,44 ^a
	B2	12,04 \pm 2,42 ^a	141,24 \pm 37,85 ^a	nd	0,41 \pm 0,28 ^a

Tableau 26 : Concentrations optimales et toxiques des ETM ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) dans les feuilles des plantes (**D'après Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Alloway, 1995**) :

Eléments	Cu	Zn	Pb	Cd
Teneurs suffisantes dans les feuilles ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	5-30	27-150	-	-
Teneurs toxiques dans les feuilles ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	20-100	100-400	30-300	5-30

L'ordre du coefficient de transfert de ces métaux vers les parties aériennes est Zn>Cu>Cd>Pb. Le Zn est plus mobile au sein de la plante que le Cu et le Cd. Il est transféré des racines vers les parties aériennes où ils se concentrent dans les chloroplastes, les vacuoles et les membranes cellulaires (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**). Le principal mécanisme de tolérance au Zn consiste en l'immobilisation du métal dans les vacuoles (**Marschner, 1995**). La forme Zn^{2+} est la plus courante et la plus mobile dans les sols. Faiblement adsorbé sur les composants minéraux (argiles, hydroxydes de Fe et d'Al) et organiques, le Zn est l'élément le plus biodisponible (20 à 40 % du Zn total) par rapport aux autres ETM dans les sols et cette

biodisponibilité augmente dans les sols légers et acides (**McBride, 2002**). Pour les autres éléments métalliques, les plants de mélèze ont montré une forte capacité à séquestrer ces éléments dans la partie racinaire. Dans le cas du Cu, les mécanismes exacts de l'absorption sont relativement méconnus chez les plantes (**Greger, 1999**). Néanmoins, ils dépendent probablement de transporteurs spécifiques de la membrane plasmique présentant une haute affinité pour le Cu^+ (transporteurs de type COPT) (**Puig et al., 2007**). Le Cu racinaire est principalement apoplasmique, donc non absorbé à l'intérieur des cellules (**Marschner, 1995**). D'autres études ont montré que le Cu était accumulé dans un premier temps au niveau des racines, puis mobilisé vers les parties aériennes (**Jarousch-Wehrheim et al., 1996**). Les résultats obtenus sont contradictoires avec ceux de **Kabata-Pendias et Pendias (1992)** et **Loué (1993)** qui ont suggéré que l'absorption et la translocation du Cu dépend étroitement de l'état nutritionnel de la plante et que sa mobilité est maximale dans le cas d'une nutrition azotée de luxe. Pour pénétrer dans la cellule, le Cd est un compétiteur connu du Ca en empruntant les canaux calciques membranaires (**Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999 ; Greger, 1999**). **Greger (1999)** a constaté que 70 % du Cd entrerait dans la racine par cette voie. Le Cd semble emprunter davantage de transporteurs membranaires que les autres ETM probablement parce qu'il est l'un des ETM les plus mobiles dans le sol et qu'il entre ainsi davantage en compétition avec les éléments essentiels au développement des plantes comme le Ca, le Cu, le Zn ou le Fe (**Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999**). La toxicité du Cd est directement liée aux capacités élevées de translocation des racines vers le reste de la plante. Par contre, cette translocation reste limitée chez le mélèze. Comme le Cd, le Pb peut emprunter les canaux calciques. Il a été montré que la l'adsorption de Pb au niveau des groupes fonctionnels des parois cellulaires dans l'apoplasme expliquerait son accumulation dans les racines et sa translocation limitée vers les parties aériennes de la plante (**Tung et Temple, 1996**). Certains auteurs (**Seregin et al., 2004 ; Sharma et Dubey, 2005**) ont suggéré une absorption préférentielle par l'apex des racines et que le Pb apoplasmique n'atteint pas le xylème lorsque l'endoderme est mis en place. Les bandes de Caspary limitent partiellement le franchissement de l'endoderme jusqu'au cylindre central. Pour **Verkleij et Schat (1990)**, cette restriction représente un facteur de tolérance des plantes. De nombreux travaux (**Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Tung et Temple, 1996 ; Yoon et al., 2006**) ont montré une très faible translocation du Pb vers les parties aériennes des plantes. En effet, il est important que le Pb ne soit pas transféré vers les feuilles car il affecte l'activité photosynthétique, la synthèse de chlorophylle ou encore la synthèse d'enzymes anti-oxydantes (**Kim et al., 2003**). En plus de la compartimentation cellulaire (évoquée dans le cas du Zn) et la restriction partielle d'absorption, la tolérance aux ETM est assurée par la présence intracellulaire de ligands organiques qui assurent leur chélation. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands ont été caractérisés : Les métallothionéines, les phytochélatines, les acides organiques et les acides aminés. Le système anti-oxydant joue un rôle central dans la détoxification des ETM ayant pénétrés dans la cellule. Il est connu que les ETM engendrent un stress oxydatif par la formation d'une grande quantité de formes réactives dérivées de l'oxygène ROS (**Siedlecka et Krupa, 2002 ; Panda et Choudhury, 2005**). Tant que le stress engendré n'est pas trop fort pour la capacité de défense de la plante, ces auteurs ont mentionné que la principale réponse consiste en une augmentation des activités SOD, enzyme clé de la voie de détoxification. Beaucoup d'études dont celle de **Drazkiewicz et al.**

(2007) ont montré que l'activité SOD est stimulée chez les plantes soumises à un stress métallique, tandis que d'autres affirment son inhibition (**Ahmad et al., 2009**). Ainsi, **Piquery et al. (2000)**, **Sandalio et al. (2001)** et **Shah et al. (2001)** ont souligné que cette activité change selon l'espèce végétale, l'âge de la plante, la concentration du métal et les durées des périodes de stress répétées. L'examen de l'activité SOD a permis d'estimer le niveau de stress oxydatif dans les plants de mélèzes. Les boues ont engendré une stimulation significative du système antioxydant dans les tissus foliaires et racinaires des plants amendés, et ce uniquement après un mois et demi de culture. Cependant, les concentrations des ETM, et particulièrement le Cu, dans les plants amendés n'ont pas été significativement différentes de celles des plants témoins. Par conséquent, il n'est donc pas possible d'imputer l'augmentation de l'activité SOD observée dans les aiguilles et dans les racines latérales des plants amendés aux ETM. Comme les boues renferment une large gamme de contaminants, y compris un grand nombre de composés organiques encore très peu étudiés, parmi lesquels des pesticides, des dérivés médicamenteux et hormonaux, éventuellement, des phtalates, des détergents etc... et parce que certains auteurs (**Liu et al., 2009** et **Song et al., 2011**) ont montré que des activités anti-oxydantes sont induites par ces composés, il est possible qu'ces contaminants organiques pourraient être à l'origine du stress oxydatif observé chez les plants de mélèze amendés.

L'étude établie concernant les gradients de distribution des éléments étudiés dans l'écorce et les différents accroissements annuels de la tige montre que l'écorce présente les concentrations les plus élevées pour P, K, Ca, Mg, Mn, Cu et Cd. De l'extérieur vers le cœur de la tige, on observe que la distribution du phosphore est de type décroissant. Ce gradient est similaire à celui proposé par **Myre et Camiré (1994)** pour les deux mélèzes européen et laricin. Cependant, ces auteurs ont constaté le même type de distribution pour le K, tandis que nos résultats montrent uniquement une légère tendance à décroître vers le bois de cœur. Ils soulignent l'importance de ce cycle biochimique interne dans l'économie de ces éléments nutritifs (*Nutrient Use Efficiency*). Ce mécanisme de translocation se produit durant la sénescence d'un accroissement annuel. En effet, la différence importante des teneurs en P est utilisée pour délimiter la zone du xylème à haute activité métabolique (**McClenahen et al** cité par **Myre et Camiré, 1994**). A l'exception du P et K, l'ensemble des éléments étudiés sont répartis selon la distribution de type constant. Cette distribution correspond à des teneurs relativement comparables dans tous les accroissements annuels. Par contre, **Myre et Camiré (1994)** ont démontré que les éléments : Ca, Mg et Mn sont répartis selon un troisième type de distribution : le type croissant avec des teneurs croissantes vers les accroissements annuels les plus internes du xylème. Tenant compte de l'âge de nos plants (3 ans) et celui des plantations étudiées par **Myre et Camiré (1994)** (18 ans), la comparaison de la distribution des différents éléments faite ci-dessus est purement à titre indicatif car la répartition des éléments dans les accroissements annuels dépend de la différenciation du bois d'aubier en bois de cœur.

4. CONCLUSION

Les boues des stations d'épuration peuvent être bénéfiques pour les sols forestiers en augmentant leur teneur en éléments nutritifs. Cette amélioration de leurs fertilités se traduit par une augmentation de productivité. L'analyse des résultats que nous avons obtenus en conditions contrôlées permet de mettre en évidence la dynamique de la réponse des plants de mélèze à un apport de boues pour mieux cerner l'impact de cette pratique sur cet arbre.

Le **Tableau 26** montre l'évolution de certains paramètres durant les récoltes. Tout d'abord, les teneurs foliaires en N ont été significativement améliorées avec l'apport des boues dès un mois et demi de culture, tandis que majoritairement, l'ensemble des paramètres étudiés ne montre aucune différence significative à ce stade. Ainsi, l'azote est le premier élément assimilé par la plante lors de l'apport des boues. Cette amélioration est en lien avec l'assimilation direct de l'ammonium. Il s'ensuit, la demande en carbone augmente. En effet, la première campagne de mesure d'échanges gazeux, effectuée après six mois de culture, montre une augmentation significative de la fixation de CO₂ pour les plants amendés. L'abondance de l'azote favorise également le développement du feuillage (**Campagna, 1996**) qui va stimuler encore la photosynthèse afin de fournir les assimilats nécessaires. D'autre part, le suivi de la croissance de la tige montre que l'apport des boues a contribué significativement à une bonne croissance en hauteur des plants de mélèze dès le 7^{ème} mois de culture. En revanche, ce n'est qu'après 12 mois de culture que l'accumulation de la biomasse racinaire et aérienne a augmenté avec l'apport des boues, ce qui a amélioré la capacité d'absorption du P, K et autres éléments minéraux. Ainsi, l'augmentation de la quantité d'éléments assimilée par la plante suggère qu'une partie des quantités apportées par les boues a été avantageuse pour la croissance des plants amendés.

De leurs côté, les ETM (Cu, Zn et Cd) ont été également absorbé et transférés vers les parties aériennes. En revanche, le Pb est majoritairement séquestré dans les racines latérales. Ceci est en accord avec la plupart des études menées sur le transfert sol-plante des éléments traces métalliques. Néanmoins, les valeurs enregistrées étaient inférieures au seuil minimum de toxicité, ainsi aucun effet néfaste sur la plante n'a été induit par les concentrations internes de ces éléments.

Tableau 27 : Récapitulatif de l'évolution de certains paramètres durant les récoltes (→:pas d'effet ; ↗, ↗↗ et ↗↗↗ : degré de l'augmentation, - : pas de mesure)

Paramètres	Durée de culture (mois)				
	1,5	3	6	12	18
Azote	↗	↗↗	↗↗	↗↗	↗
Phosphore	→	↗	↗	↗↗	↗↗↗
Potassium	→	↗	↗	↗↗	↗↗↗
Photosynthèse	-	-	↗↗↗	-	↗↗↗
Croissance	→	→	→	↗↗	↗↗↗
Biomasse sèche	→	→	→	↗↗	↗↗↗

Chapitre IV

**Épandage de boues de station d'épuration en
parcelles boisées :**

**Quels impacts sur le continuum
sol-plante-escargot ?**

Les effets de l'épandage de boues résiduelles générées par le traitement des eaux usées domestiques sur l'escargot *Cantareus aspersus* (ex-*Helix aspersa*) ont été étudiés au cours de ce travail. La croissance des escargots et l'évolution de leurs teneurs en ETM ont été suivies. Seront présentés dans un premier temps, les résultats obtenus d'une première expérimentation réalisée *in situ* en utilisant la méthode des mésocosmes, puis dans un second temps, ceux de la deuxième expérience réalisée sous conditions contrôlées sous la forme d'une publication soumise au Journal *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

1. ETUDE SUR LE TERRAIN

1.1. BIOACCUMULATION DES ETM

1.1.1. CONCENTRATION DES ETM DANS LE SOL

Les concentrations en ETM ont été déterminées dans la litière (L) et dans le sol sous-jacent (S) présent à l'intérieur des mésocosmes installés dans les SP T' et B'. Les teneurs totales en Cu, Zn, Cd et Pb mesurées sont représentées dans le **Tableau 28**.

Tableau 28 : Teneurs moyennes en ETM dans la litière non amendées (LT') et amendées (LB') et dans le sol sous-jacent non amendées (ST') et amendées (SB') (moyenne \pm écart-type) (n=6 à 9). Les lettres signalent les différences significatives entre les traitements ($p < 0,05$, test t).

$\mu\text{g g}^{-1}$ MS	Cu	Zn	Cd	Pb
L T'	40,44 \pm 10,37 ^a	15,55 \pm 5,43 ^a	0,09 \pm 0,00 ^a	17,17 \pm 3,15 ^a
L B'	75,28 \pm 18,96 ^b	68,16 \pm 21,28 ^b	0,15 \pm 0,02 ^b	28,11 \pm 6,86 ^b
S T'	31,30 \pm 2,35 ^a	10,41 \pm 0,53 ^a	0,06 \pm 0,01 ^a	22,84 \pm 0,92 ^a
S B'	35,51 \pm 3,83 ^a	19,33 \pm 6,06 ^b	0,08 \pm 0,02 ^a	27,34 \pm 6,33 ^a

Les teneurs totales en ETM augmentent significativement dans LB' comparée à LT'. En effet, les taux d'enrichissement de LB' en Cu, Zn, Cd et Pb sont respectivement 186, 438, 166 et 163 %. Au contraire, les teneurs de l'horizon S sont similaires entre les deux traitements pour le Cu, le Cd et le Pb. Seule, la concentration en Zn augmente significativement laissant penser que le Zn des boues migrerait vers le niveau situé au dessous de la litière.

1.1.2. CONCENTRATIONS DES ETM DANS LES PLANTES

Les concentrations en ETM ont été déterminées dans les parties aériennes des plantes « *Carex pilulifera* » se trouvant à l'intérieur des mésocosmes. Les moyennes par traitement sont représentées sur le **Tableau 29**. Les concentrations en Cu, Zn et Cd retrouvées dans les plantes prélevées sont similaires entre B' et T'. Cependant, les concentrations en plomb mesurées dans les plantes prélevées dans les SP T' sont significativement ($p < 0,001$) plus élevées que celles retrouvées dans les plantes amendées.

Tableau 29 : Teneurs moyennes en ETM des plantes prélevées dans les mésocosmes des SP amendées (B') et non amendées (T') (moyenne \pm écart-type) (n=6 à 9). Les lettres signalent les différences significatives entre les traitements ($p < 0,05$, test t).

$\mu\text{g g}^{-1}$ MS	Cu	Zn	Cd	Pb
T'	8,77 \pm 0,77 ^a	53,40 \pm 21,00 ^a	0,56 \pm 0,65 ^a	2,31 \pm 0,66 ^a
B'	10,43 \pm 1,76 ^a	71,22 \pm 27,00 ^a	0,55 \pm 0,36 ^a	0,97 \pm 0,29 ^b

1.1.3. TENEURS TOTALES EN ETM DANS LES ESCARGOTS

En début d'expérimentation, 10 escargots sont introduits dans chaque mésocosmes. Ces escargots, récoltés après 14 ou 28 jours d'exposition, ont été analysés. Les quantités moyennes d'ETM accumulées dans les corps mous des escargots exposés à des sols témoins T' et à des sols amendés B' sont présentées dans la **Figure 88**. Les escargots ne montrent aucune accumulation du Zn au cours de la durée d'exposition et les teneurs sont similaires à celles enregistrées chez les escargots à t0. Dans le cas du Cu, les teneurs totales des escargots restent également stables entre 0 et 14 jours d'exposition. Cependant, à 28 jours d'exposition, elles augmentent significativement au niveau des escargots de la modalité B' par rapport à celles initialement présentes à t0. Toutefois, cette augmentation n'est pas assez élevée pour que les niveaux atteints soient significativement différents de ceux enregistrés chez les escargots témoins. Par contre, les teneurs totales en Pb et en Cd retrouvées dans les escargots exposés sont significativement plus élevées que celles mesurées chez les escargots à t0 (environ 5,5 et 1,5 fois respectivement pour le Pb et Cd) et ce dès le premier prélèvement (14 jours). De plus, après 28 jours d'exposition, seul le Cd montre une augmentation significative ($p < 0,05$) de sa teneur chez les escargots exposés aux sols amendés (B') comparés aux escargots témoins.

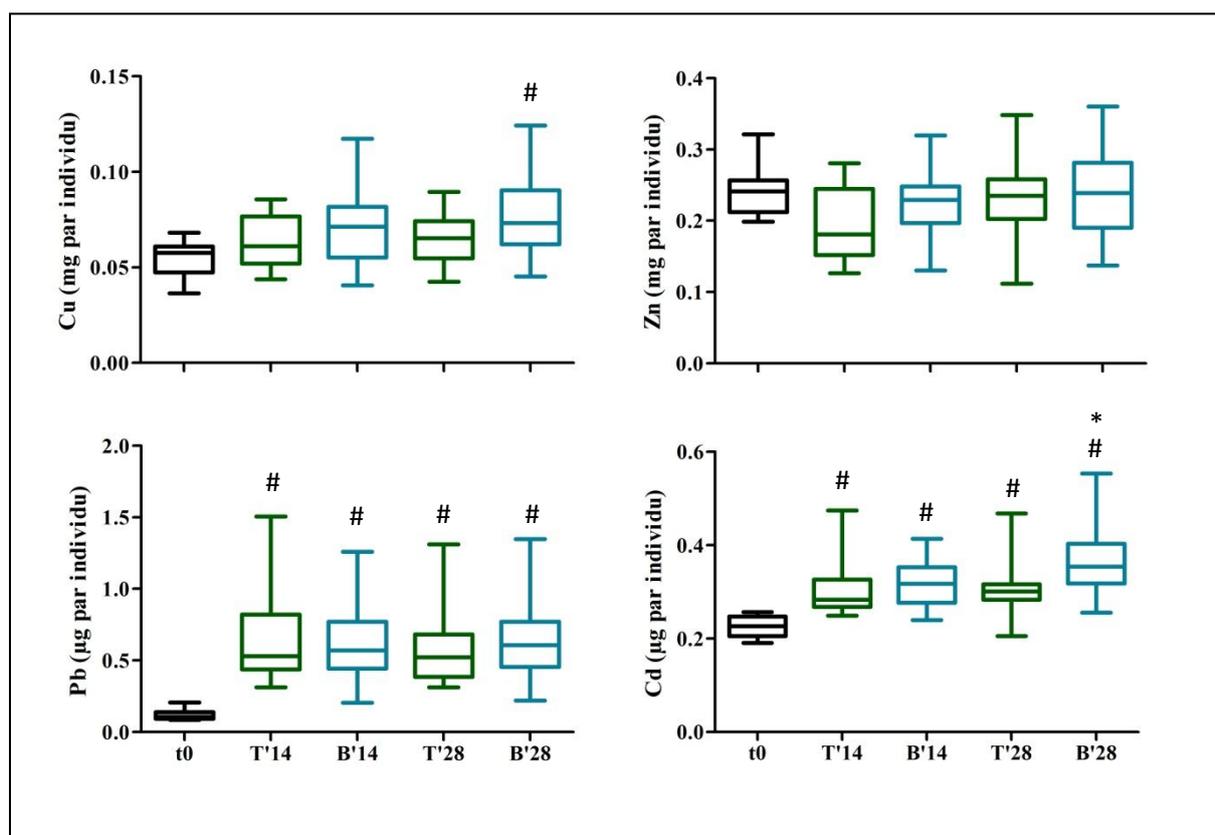


Figure 88 : Variations des teneurs en ETM accumulées dans le corps mou des escargots exposés durant 14 et 28 jours à des sols amendés (B' en bleu clair) et non amendés (T' en vert). Aucune différence significative n'a été observée. Ainsi, les valeurs ont été cumulées (n=18 pour B' et n=12 pour T'). Le trait à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane, la limite supérieure et inférieure de la boîte aux quartiles, les barres aux valeurs minimum et maximum. * différence significative entre les traitements T' et B' d'un même prélèvement ($*p < 0,05$, test t) et # différence significative par rapport à t0 (test de Tukey).

1.2. SURVIE ET CROISSANCE

Les effets sublétaux ou effets indirects sont déterminés par un suivi de la croissance des escargots au cours des 28 jours d'exposition : les escargots sont pesés avant leur introduction dans les mésocosmes, ils sont également pesés en fin d'expérimentation. Les résultats sont présentés ci-dessous, à partir des mesures de la biomasse fraîche totale (**Tableau 30**), de la biomasse sèche du corps mou entier (**Figure 89**) et de la masse de la coquille (**Figure 90**).

1.2.1. LA SURVIE

Le taux de survie observé est respectivement de 98,3 % et de 100 % pour les escargots exposés au sol non amendé (sous-placettes T') et amendé avec les boues (sous-placettes B'). Par conséquent, la mortalité n'a pas dépassé 1 % sur le nombre total des escargots. Celle-ci a été recensée dans le groupe témoin placé dans la SP T'4 en fin d'expérience. Toutefois, il n'existe aucune différence significative entre les deux modalités T' et B'.

1.2.2. LA MASSE TOTALE

La moyenne des masses initiales des escargots était $> 5 \pm 0,3$ g. Ainsi, l'exposition pendant 14 et 28 jours montre une légère augmentation de la masse totale suivie d'une baisse pour atteindre la valeur moyenne de la masse de départ (5,0 g). Il est à noter qu'aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements B' et T' (**Tableau 30**).

Tableau 30 : Biomasse fraîche totale (g) des escargots placés dans les mésocosmes des SP amendées (B') et non amendés (T') après 14 et 28 jours d'exposition. Les astérisques (***) indiquent une différence significative entre le prélèvement à 28 jours comparé avec celui du 14^{ème} jour ($p < 0,001$, test t) et les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes entre les traitements d'un même prélèvement.

	14 jours	28 jours
T'	5,5 \pm 0,2 ^a	5,0 \pm 0,2 ^{a***}
B'	5,5 \pm 0,3 ^a	4,9 \pm 0,2 ^{a***}

1.2.3. LA BIOMASSE SECHE

La biomasse sèche du corps mou entier des escargots, représentée sur la **Figure 89**, diminue significativement et d'une façon similaire chez les deux traitements après 14 et 28 jours d'exposition ($p < 0,01$ et $p < 0,001$ respectivement). Cette chute de biomasse est de l'ordre de 30 % au deuxième prélèvement chez les deux traitements.

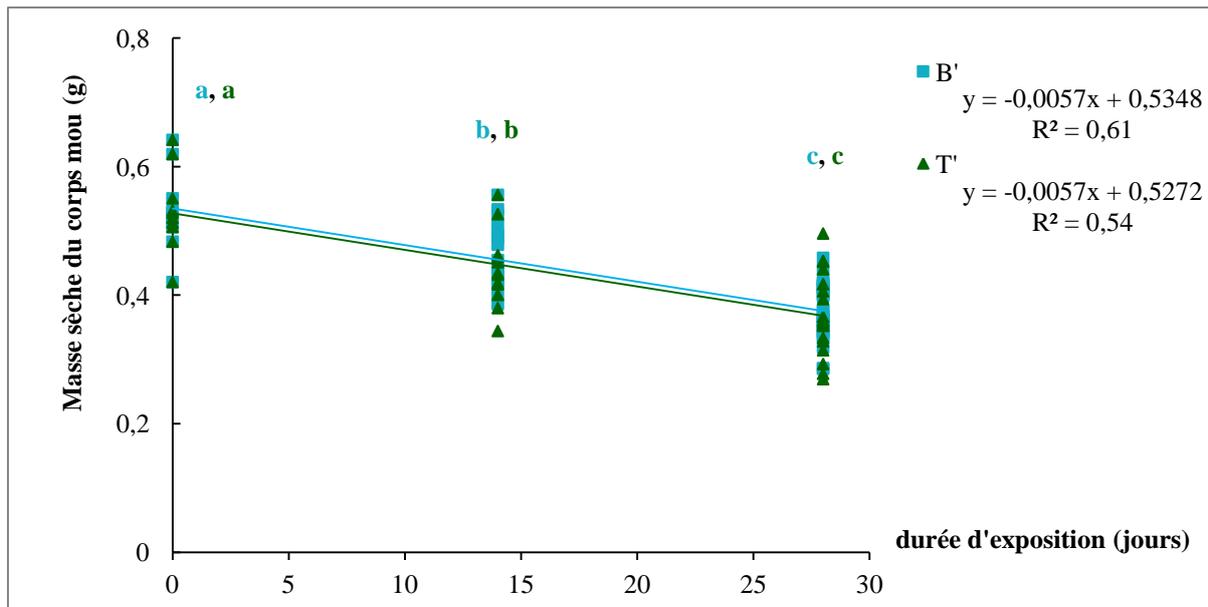


Figure 89 : Variations de la biomasse sèche exprimée en g des escargots placés dans les mésocosmes des SP amendées (B') et non amendées (T') après 14 et 28 jours d'exposition. Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test t) et entre les prélèvements (test de Tukey).

1.2.4. LA MASSE DE LA COQUILLE

Une faible croissance de la coquille a été observée au cours des 14^{iers} jours d'exposition chez les deux traitements. D'après les équations des deux droites de régression, on remarque que cette légère augmentation est deux fois supérieure chez les escargots du traitement B' comparée au témoin. Entre 14 et 28 jours d'exposition, la masse de la coquille reste constante ($0,6 \pm 0,1$ g) et ne présente aucune différence significative ni entre les deux traitements B' et T', ni entre les deux prélèvements (**Figure 90**).

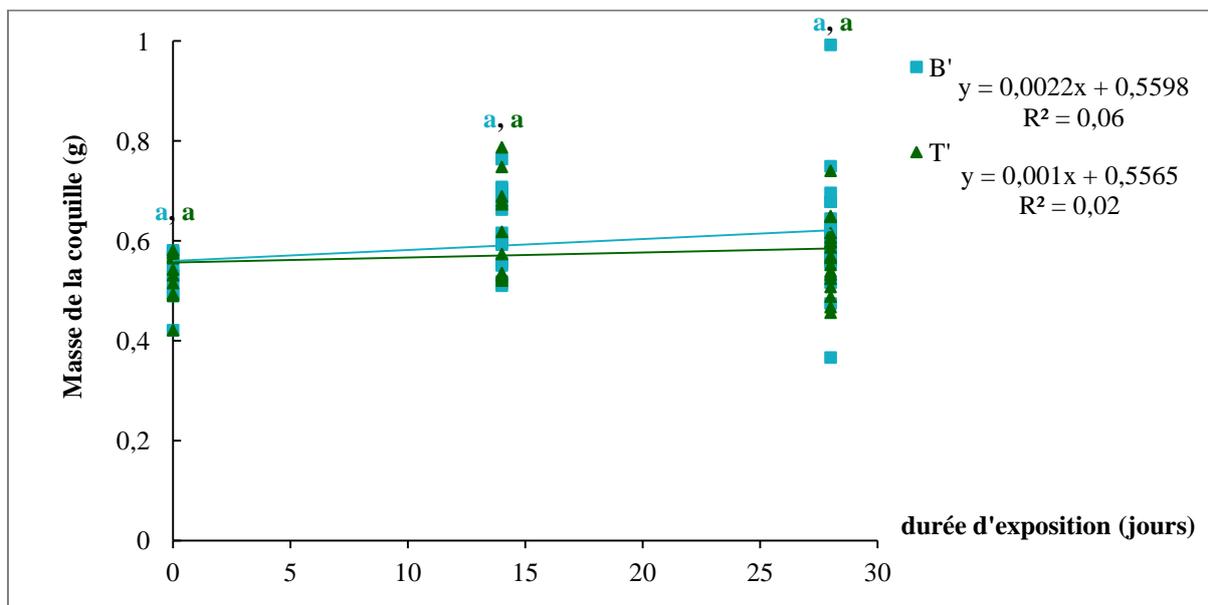


Figure 90 : Variations de la masse de la coquille exprimée en g des escargots placés dans les mésocosmes des SP amendées (B') et non amendées (T') après 14 et 28 jours d'exposition.

2. DISCUSSION

2.1. TENEURS DU SOL EN ETM ET LE TRANSFERT SOL-PLANTE

L'apport des boues a entraîné une augmentation des teneurs en ETM de la litière. Ces ETM (Cu, Pb et Cd) ont été immobilisés par adsorption à la matière organique limitant leur lixiviation. Seul, le Zn atteint l'horizon sol en raison de sa plus grande mobilité dans les sols acides (**Hatira et al., 1990**). Le même profil de résultats a été obtenu dans le **Chapitre I** où nous avons étudié les effets de l'épandage des boues sur les caractéristiques physico-chimiques du sol. De plus, les travaux de **Planquart et al. (1999)**, **Bhogal et al. (2003)**, **Moffett et al. (2003)**, **Agbenin et Olojo (2004)** et **Arias et al. (2006)** ont également montré des résultats similaires soulignant la mobilité accrue du zinc en conditions de sol acide. La présence de P, en particulier à des concentrations élevées, augmente l'adsorption de cet élément attribuée principalement à la formation d'un complexe P-Zn dans les surfaces colloïde (**Pérez-Novo et al., 2011**). Toutefois, les teneurs en ETM mesurées dans le sol de Mélisey sont soit voisines des valeurs moyennes enregistrées dans les différents sols, c'est le cas du Cu et Pb ou bien largement inférieures comme c'est le cas pour le Zn et le Cd (**Tableau 31, Juste et al. 1995**). Par ailleurs, ces teneurs sont largement inférieures aux valeurs limites fixées pour les sols, destinés à recevoir les boues urbaines (**Baize et Tercé, 2002**).

Tableau 31 : Teneurs limites et teneurs moyennes en ETM des sols :

($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	Cu	Zn	Cd	Pb
Teneurs limites Arrêté 08/01/1998	100	300	2	100
Teneurs du sol de Mélisey	7,1	61	0,2	13
Teneurs moyennes dans les sols	10 à 30	70 à 90	0,2 à 0,5	10 à 30

Après le sol, nous allons nous intéresser au transfert des ETM vers la plantes *in situ*. L'apport des boues dans les sous parcelle n'a pas augmenté significativement les quantités des ETM mesurées dans les feuilles des plantes issues des mésocosmes, et ce en dépit de l'enrichissement de la litière pour les 4 ETM. En effet, les racines des plantes étant ancrées dans l'horizon supérieur du sol, elles ne puisent pas leurs nutriments dans la litière. Ce qui expliquerait, les faibles teneurs observées chez les plants des sous-placettes amendées. De plus, chez les plantes récoltées *in situ*, les teneurs foliaires en ETM essentiels à savoir le Cu le Zn correspondent aux concentrations suffisantes pour la croissance. Par contre, les valeurs des ETM non essentiels (Pb et Cd) sont largement en-dessous du seuil de toxicité (**Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Alloway, 1995**). Le comportement de chacun de ces quatre éléments lors des transferts sol-plante a été détaillé dans la discussion du **Chapitre III**.

2.2. BIOACCUMULATION DES ETM DANS LES ESCARGOTS

Les teneurs totales en Zn dans les escargots restent stables et similaires entre les traitements T' et B'. Ceci pourrait s'expliquer soit par l'absence de transfert de cet élément, soit par le maintien d'un niveau constant de sa teneur interne dû à un équilibre entre l'absorption et l'élimination (détoxication et excrétion) (**Gimbert et al., 2008b**). Cependant,

l'augmentation des concentrations de cet élément détectée en fin de période d'exposition (28j) (0,46 ; 0,47 et 0,64 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS pour 0, 14 et 28 jours d'exposition- Aucune différence n'est détectée entre B' et T') n'est probablement liée qu'à la perte de biomasse observée. Dans notre étude, le comportement du Cu est relativement proche de celui du Zn. Plusieurs travaux soulignent la stabilité des concentrations de ces deux éléments chez les escargots en croissance. Cette aptitude, résultant des mécanismes de régulation, n'est possible qu'à une certaine gamme de concentration dans le sol (**Heikens et al., 2001; Van Straalen et al., 2001**). Les travaux de **Scheifler et al., (2003)** ont montré que la concentration du Zn a augmenté significativement chez les escargots exposés pendant 5 semaines aux sols amendés avec les boues liquides, tandis que celle du Cu ne montre aucune différence significative. Ces auteurs ont attribué cette augmentation à la nature des boues appliquées, riches en zinc (700 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS). Il convient de souligner que les boues épandues sur le site de Mélisey contiennent approximativement la même concentration (620 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS). Une autre étude de **Kurihara et Kadowaki (1988)** sur des escargots des rizières (*Cipangopaludina chinensis malleata* Reeve) a également montrée une accumulation significative du Cu et du Zn dans le corps mou suite à leur exposition dans des parcelles amendées de boues compostées riche en cuivre et en zinc (232 et 681 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS respectivement).

La mise en place des escargots sur les parcelles T' et B' s'accompagne d'une augmentation significative des teneurs en Pb en comparaison avec le t0. Ces résultats peuvent s'expliquer essentiellement par un transfert direct du Pb présent dans le sol de Mélisey vers les escargots car l'apport de boues n'a pas augmenté d'avantages leur teneur en Pb. Les travaux de **Laskowski et Hopkin (1996a), Beeby et Richmond (2002) et Gimbert et al. (2008b)** ont montré que les escargots excrètent le surplus du Pb dans des concrétions (voie de détoxification) ce qui permettrait le maintien d'une concentration en dessous des seuils de tolérance. Dans le cas du Cd, les résultats sont similaires à ceux du Pb, par contre l'apport des boues augmente significativement le pool du Cd dans les escargots et ce après 28 jours d'exposition. **Scheifler et al. (2003)** ont également observé une augmentation significative du Cd ($p < 0,05$) dans le corps mou des escargots sans conséquence sur leur croissance et ce après 7 semaines d'exposition aux sols amendés par des boues compostées. La régulation des métaux non essentiels dont le Cd est très faible voire nulle, entraînant leur accumulation dans les organismes (**Jess et Marks, 1998**). A la différence du Pb, le Cd s'accumule dans le corps mou sans aucun effet négatif sur les paramètres de croissance. Une fois à l'intérieur des cellules, le Cd est connu pour ses effets délétères qui peuvent aboutir à la mort cellulaire. Cependant, les cellules ont plusieurs stratégies pour atténuer la toxicité de cet élément principalement la synthèse des métallothionéines (MT). Plusieurs travaux ont montré que les MT sont fortement induites suite à une exposition au Cd (**Beyersmann et Hechtenberg, 1997**). Ainsi, les MT auront pour rôle de neutraliser les ions Cd après chélation ce qui permettrait leur accumulation.

Des travaux antérieurs ont montré que les ETM accumulés par les escargots peuvent être transférés à partir de différents compartiments (l'air, l'eau, le sol et la plante) (**Notten et al., 2006, 2008 ; Tham et Gary, 2009**) via l'alimentation (plantes, litière et sol) ou par contact (**Dallinger et al, 2001 ; Coeurdassier et al., 2002; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002 ; Marigomez, et al., 2002 ; Scheifler, et al., 2003 ; Gimbert et al., 2008a ; Tham et Gary, 2009**). Lors de cette expérience, seuls les transferts sol-escargot et plante-escargot ont été

étudiés. Les concentrations du Pb et du Cd dans les plantes *in situ* n'ont montré aucune accumulation des ETM avec l'apport des boues. Ainsi, le transfert à partir de la plante vers l'escargot a été probablement moins important. Par conséquent, les teneurs en Pb dans les escargots pourraient s'expliquer par le transfert de cet élément à partir des teneurs naturellement présentes dans le compartiment « sol ». Comme pour le Pb, la voie de transfert du Cd du sol vers l'escargot semble être la plus importante lors de l'exposition. Cependant, l'effet des boues suggère un transfert à partir de la litière contaminée. Il semble donc que le Cd soit transféré à partir des deux compartiments différents « le sol » et « la litière+boues ». Une synthèse des voies de transfert des ETM étudiés est présentée dans la **Figure 91**.

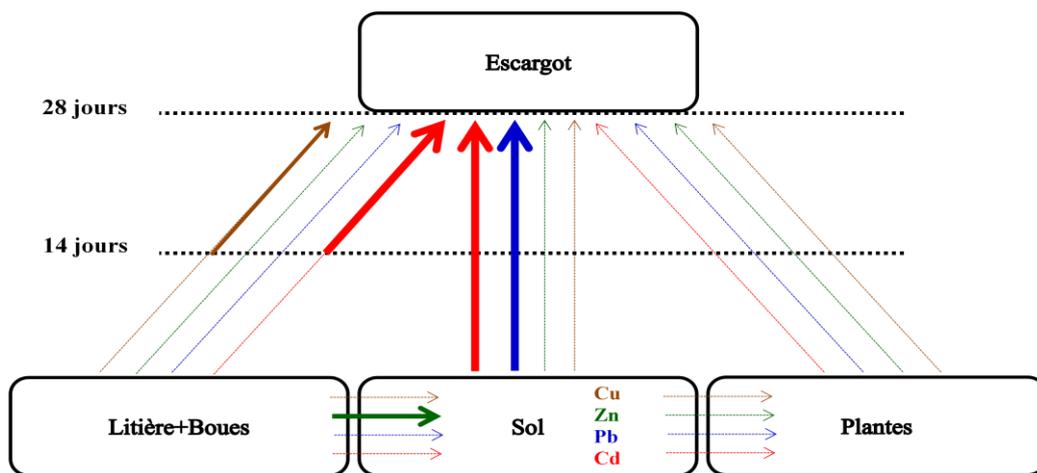


Figure 91 : Représentation schématique des voies de transfert des ETM dans le continuum sol-plante-escargot (les flèches en tirets indiquent les voies de transfert faible ou nulle, selon l'épaisseur, les flèches continues indiquent l'importance du transfert).

Dans le cas d'impossibilité d'une absorption sélective des ETM, nous supposons que les mécanismes d'accumulation et d'élimination du Cu et du Zn sont en état d'équilibre à t_0 . Ainsi, la quantité du métal absorbée est égale à celle éliminée. Le stock assimilé à cette date a été transféré via la nourriture non contaminée (Helixal® 1^{er} âge et 2^{ème} âge) qui contient 0,2 et 0,15 mg g⁻¹ MS de Cu et de Zn respectivement. Quant au Pb, les teneurs sont inférieures au seuil de détection dans l'aliment. Ceci explique les quantités trop faibles accumulées dans les escargots à t_0 . Toutefois, une accumulation importante du Pb dès 14 jours d'exposition a été observée pour atteindre le point d'équilibre, au-delà duquel, le comportement du Pb deviendrait similaire à celui du Cu et du Zn **Gimbert et al. (2008b)**. Dans le cas du Cd, la cinétique d'accumulation est plus importante que celle d'élimination et ce durant toute la durée de l'exposition. Ce qui confirme une accumulation linéaire démontrée par **Gimbert et al. (2008b)**. Une synthèse des phénomènes d'absorption, d'assimilation et d'élimination des ETM étudiés est présentée dans la **Figure 92**.

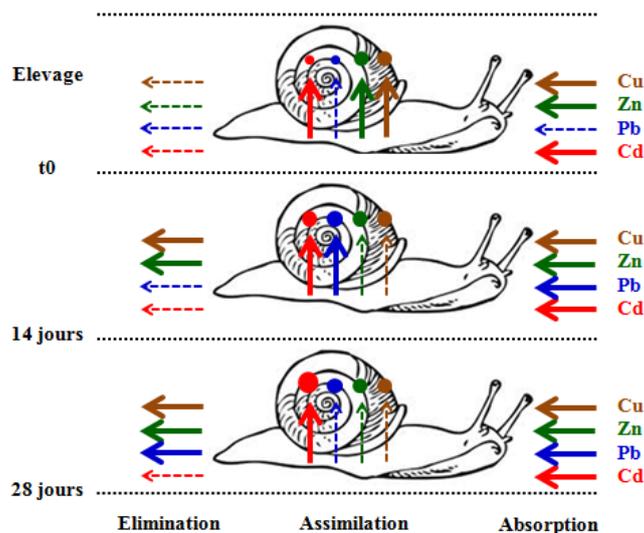


Figure 92 : Représentation schématique des mécanismes d'accumulation et d'élimination des ETM durant l'exposition (les flèches en tirets et continues indiquent respectivement les mécanismes faibles et importants, le rond indique les variations des quantités assimilées durant l'exposition).

2.3. LA CROISSANCE DES ESCARGOTS

La biomasse sèche des escargots est réduite quelle que soit la modalité. En effet, la perte est de l'ordre de 30 % en fin de l'expérience. Au vu de ces résultats, les boues ne semblent pas avoir d'effet toxique sur les escargots. La mortalité et la décroissance pondérale seraient dues aux conditions environnementales, telles que la température, la photopériode ou la nature de la végétation *in situ*. Une température moyenne proche de 20 °C, une humidité supérieure à 80 % et une photopériode 18h de lumière/6h d'obscurité ont été définies comme les conditions optimales de la croissance des escargots (**Gomot, 1997**). Lors de cette expérience, les moyennes de température et d'humidité sont respectivement 13,4 °C et 84 %. Ainsi, la croissance réduite des escargots pourrait provenir des faibles températures observées durant la période d'exposition (températures très basses avec des minimas de 3 °C) (**Réf. Internet 3**) et d'une photopériode avec une phase nocturne importante (septembre/octobre). Ces conditions, non conforme aux préférences définies au laboratoire pour une croissance optimale, influent les cycles d'activité et de repos des escargots et, par conséquent, leur croissance. **Jess et Marks (1998)** ont suivi la croissance des escargots *Cantareus aspersus* à deux températures sur 10 mois. Les résultats obtenus ont montré que la croissance est plus importante à 20 °C qu'à 15 °C : au bout de 19 semaines, les escargots atteignent 7,3 g au cours des expériences menées à 15 °C contre 17,2 g pour 20 °C. Lors des prélèvements, les escargots se sont rétractés à l'intérieur de leur coquille et se sont collés fermement aux parois des mésocosmes. Ce comportement s'observe chez les escargots lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables. L'autre hypothèse qui pourrait expliquer cette perte pondérale serait la non appétence de la végétation *in situ*. Ainsi, le jeûne imposé durant la durée d'exposition serait la cause de cette diminution de la masse. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment par **Scheifler et al. (2003)** qui ont observé une légère diminution de la masse fraîche totale des escargots après 7 semaines d'exposition à des boues liquides ou compostées.

3. ETUDE AU LABORATOIRE

Cette expérience a fait l'objet d'une publication soumise au Journal *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Risk assessment of trace metal contaminants in sewage sludge applied to forest soil: effects on bioavailability and transfer along a soil-plant-snail food chain

Bourioug M.¹, Gimbert F.¹, Laffray X.², Alaoui-Sehmer L.¹, Benbrahim M.³, Badot P.M.¹, Alaoui-Sossé B.¹

¹: *Laboratoire de Chrono-environnement, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, Université de Franche-Comté, Place Leclerc, F-25030 Besançon cedex, France.*

²: *Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN) – Département Systématique et Evolution, Case 39, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France.*

³: *RITMO Agroenvironnement, ZA Biopôle, 37 rue de Herrlisheim, CS 80023, F-68025 Colmar cedex, France.*

Tel.: +33 381 665 730

Fax: +33 381 665 797

E-mail: badr.alaoui-sosse@univ-fcomte.fr

3.1. ABSTRACT

Cu, Zn, Pb and Cd concentrations in the soil-plant (*Lactuca sativa*) continuum were measured after sewage sludge (SS) amendment. The effects on growth and trace metal bioaccumulation in snails (*Cantareus aspersus*) were investigated. The application of sewage sludge increased Trace Metal (TM) concentrations in top soil. But, the metal concentrations in lettuce leaves did not reflect the levels in the soil except for Zn. Lettuce leaves were the main source of Zn, Cu and Cd in exposed snails. For Pb, a major portion is bound to the cell walls and deposited in apoplast region. Thus, the observed bioaccumulation suggested that Pb was directly transferred to snails via the soil. TM contents accumulated in snails do not result in toxic effects. In the meantime, growth of snails was significantly stimulated at high sludge application. TM levels accumulated in snails exposed to two potential sources of contamination may correspond to a hormesis effect. The following hypothesis can be put forward to explain this stimulatory effect. One can consider that the increased growth rate of snails may be due to enhanced nutritive contents of lettuce leaves exposed to SS.

Keywords: sewage sludge, *Cantareus aspersus*, *Lactuca sativa*, trace metal, food chain

3.2. INTRODUCTION

Sewage sludge (SS) is a by-product resulting from the wastewater treatment process. In France and other European countries, the quantity of SS is increasing while the usual possibilities of disposal and valorization are not progressing. Characteristics of SS depend on wastewater treatment processes and sludge treatment (**Singh and Agrawal, 2008**). Generally, SS contains organic matter, macro- and micronutrients (**Roy and Couillard, 1997; Singh and Agrawal, 2008**). The utilisation of SS in agricultural fields is often considered of high interest due to the nutritional input and low cost. Indeed, the costs involved in using mineral fertilizers are reduced and the system becomes more sustainable (**López-Mosquera et al., 2002**). However, an excessive spreading could also lead to a soil contamination with trace metals (TMs) and other organic pollutants usually contained in SS and that may be transferred along the food chain. As a consequence, the public opinion and more and more farmers are now reluctant to this practice. An alternative solution could consist in spreading the SS on forest lands (**Roy and Couillard, 1997**), which should present less risk for human and cattle health (**Couillard and Grenier, 1989**). Also, there are some forest soils with very poor productivity due to their low fertility (**Rosa et al., 2007**).

Woody biomass is one of the most important renewable energy sources. To produce sufficient amounts of woody biomass in an economic way, fast-growing trees are usually planted in short rotation coppices (SRC), which will increase the rate of nutrient removal from the sites being harvested. Thus, there are indications showing an increasing interest for sewage application to forests and short-rotation biomass for firewood. This alternative is currently at experimental phase and requires intensive monitoring of ecosystem components such as plant, soil, water and fauna to identify its possible positive or negative impacts on plant productivity, environment and human health. One of the ways to obtain information on the presence of TMs is to perform quantitative measurements: the present study is focused mainly on sludge effects on soil contamination and plant bioaccumulation. Among previous studies conducted in situ, few of them were focused on food chain contamination.

TMs are taken up and accumulated in organisms, and are transferred through the food chain (**Laskowski and Hopkin, 1996; Scheifler et al., 2002; Vijver et al., 2004; Carbonell et al., 2009**). The SS chemical composition may indicate the possible extend of contamination, but it provides less information about the bioavailability of TM contents once applied to the forestland. The use of biological models to assess pollution has notably developed during the last few decades. Terrestrial snails, which are herbivorous and detritivorous, living at the soil-plant-atmosphere interface, may profitably be used as monitor organisms. First, these organisms are known for their ability to accumulate environmental contaminants. Second, snails are a key component in terrestrial ecosystems, and can contribute significantly to the transfer of pollutants to primary consumers and terrestrial predators (**Dallinger et al., 2001**). **Gomot-De Vaufleury and Kerhoas (2000), Coeurdassier et al. (2002), Gomot-De Vaufleury and Pihan (2002) and Scheifler et al. (2002)** have developed a standard test (**ISO 15952, 2006**), which investigates the effect of pollutant exposure by food and/or soil on juvenile *Cantareus aspersus* (syn. *Helix aspersa*) growth over a period of four weeks.

The bioavailability of these metals after SS application can be determined by transfer evaluation through the food chain. The aim of the present study is to investigate the TMs bioavailability and their transfer into a soil-plant-snail food chain, and to evaluate the potential effects of metal accumulation in snail. This experiment was designed to determine various transfer routes, possible toxicity, and growth responses according to SS rates increase. Experimental data are analyzed by a kinetic modeling approach for assessing the contaminant dynamics in time.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. SOIL AND SEWAGE SLUDGE (SS)

The soil used in this study was collected from a forested area located at Mélisey, Haute-Saône - France (47°753'Latitude, 6°580'Longitude). It was taken within the 20 cm top soil layer and sieved through a 1 cm mesh size. The SS was obtained from Mélisey Wastewater Treatment Plant and homogenized before use. The physico-chemical characteristics of soil and SS are shown in **Table 32**.

Tableau 32 : Characteristics of soil and sewage sludge used in the experiment.

Parameters (unit)	Soil	SS	Soil limits ^a	SS limits ^a
Cu ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)	10	990	100	1000
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)	30	620	300	3000
Pb ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)	16.3	35.7	100	800
Cd ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$)	0.1	1.5	2	10
Ca ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$)	0.1	13.3		
Mg ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$)	0.02	3.7		
N total (%)	0.1	7.2		
C total (%)	2.1	41.6		
P total ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$)	0.2	15.5		
pH _{water} (2:5)	4.8	5.7		

^a: French regulatory limits (08/01/98) for concentration of TMs in SS for agricultural use (MEEDDAT, 2009).

3.3.2. EXPERIMENTAL PROTOCOL

Seven weeks before the start of the snail exposure, lettuce plants *Lactuca sativa* were raised from seeds (3 weeks) into a mixture of sand and vermiculite (10:1, v:v) and seedlings were transplanted into plastic containers (68×38×15 cm) filled with control (non amended) soil (**Control Lettuce, CL**) or amended soils (**Amended Lettuce, AL**) (3, 30 and 60 Mg ha⁻¹ DW). Then, for each treatment, sixty plants were grown in a greenhouse (20°C) with natural light during four weeks. Because of scarce growth, CL was improperly to feed the snails. As a consequence, it was replaced by commercial lettuce.

Groups of 12 juvenile snails, *Cantareus aspersus* (formerly *Helix aspersa aspersa*), aged 4 weeks and weighing (1.0 ± 0.2 g) (according to the standard ISO 15952, 2006), were exposed for 28 days in triplicate transparent polystyrene containers (24×21×8 cm) (ref. E1DBBAC001, Charles River IFFA-CREDO, 69 L'Arbresle) filled with 1 kg of **control soil (CS)** or **amended soil (AS)** (3, 30 and 60 Mg ha⁻¹ DW). Deionized water was added to reach 50-75 % of the field capacity. Each snail was fed with 0.6 g of fresh lettuce (CL or AL) which

was offered in Petri dishes and renewed three times by week. At the same time, feces were removed and the containers were cleaned. The experiment was conducted in a climate-controlled room ($20 \pm 2^\circ\text{C}$; 80-90 % RH; 18 h L: 6 h D).

After 7, 14 and 28 days of exposure, four snails were randomly sampled in the three replicates of each treatment. Soil (surface layer) and lettuce samples were also taken for further analyses of metal contents.

3.3.3. METAL ANALYSIS

For soil (< 2 mm), dried samples (60°C , 4 days) were placed in an agate mill and ground until a fine powder was obtained. About 1 g was digested in 10 mL 1:3 HNO_3 (65 %): HCl (37 %) at 150°C for 2h on a hot plate. The sample volume was made up to 40 mL with distilled water.

The lettuce leaves were dried as soil samples (60°C , 4 days) and ground in a ball mill (Retsch MM 200, Germany). Samples, about 0.1 g, were added to 2 mL of HNO_3 (65 %) and digested on a hot plate for 3h at 125°C . Thereafter the volume was brought to 30 mL with distilled water and the sample was then filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ filter tip.

After sampling, the snails were kept without food in clean containers for a 48h period of fasting (feces were removed after 24h) and sacrificed by deep freezing at -80°C . After thawing, the soft body was removed from the shell and weighted. The soft body was freeze-dried to constant mass ($0.11 \pm 0.04 \text{ g}$) and individually digested in 5 mL HNO_3 (65 %) at room temperature for 1h followed by 3h at 90°C . The sample volumes were made up to 15 mL with distilled water. Snail shells were measured (mass and diameter) but not included in any digestion procedure since the shell is not a sink for TMs (**Laskowski and Hopkin, 1996**). All the reagents used were of analytical grade (Carlo Erba).

The metal concentrations (Cu, Zn, Cd, and Pb) and minerals elements (Ca, Mg) were estimated using inductively coupled plasma (ICP-MS). The values obtained are in good agreement (within 5 %) with the certified concentrations in standard reference (TORT-2 Lobster hepatopancreas, NRCC-CNRL, Canada; calcareous loam soil n°141R from BCR, Belgium and Virginia tobacco leaves “CTA-VTL-2”, Poland), confirming the reliability of our analytical procedure.

3.3.4. STATISTICAL ANALYSIS

Soil and lettuce contaminations following SS amendments were compared between treatments using linear models with metal concentrations in soil or shoots as dependent variables and the treatment as explanatory variable (**Grafen and Hails, 2002**).

Snail growth over the exposure duration was assessed using linear mixed-effects models with individual fresh or dry mass as dependent variable, the treatment as explanatory variable and the container as random effect (**Pinheiro and Bates, 2000**).

Concerning trace metal accumulation in snails, we preferred use body burdens rather than concentrations since the latter can be affected by changes of mass of the organism over the experiment (**Gimbert and de Vaufleury, 2009**). Moreover, a first modeling attempt using a one-compartment model (**Gimbert et al., 2008**) evidenced the absence of excretion whatever

the metal and the treatment considered (data not shown). Hence, the bioaccumulation data were fitted using the following linear model (Eq. 1):

$$Q_{sn}(t) = Q_{sn}(0) + a * t \quad (\text{Eq. 1})$$

where $Q_{sn}(t)$ = metal body burdens per snail ($\mu\text{g.snail}^{-1}$ dry weight) at time t ; a = assimilation flux ($\mu\text{g}_{\text{metal}}.\text{snail}^{-1}.\text{d}^{-1}$) = bioavailability estimate (**Gimbert et al., 2008**); t = time (days). $Q_{sn}(0)$ is the average metal body burden measured in ten snails at the beginning of the experiment.

The bioaccumulation model was fitted to the data using a lme procedure with snail body burdens as dependent variable, the treatment as explanatory variable and the container as random effect.

For all models (lm and lme), when residuals were skewed, variance functions (power and exponential) were applied and the best model was selected according to Akaike's Information Criterion (AIC, pgirmess package). The significance of the regressions and their coefficients of determination (r^2) were determined using an analysis of variance (Anova, $p < 0.05$). The post-hoc test of Tukey (Tukey's honest significant difference) was applied to determine the statistical differences for pairwise comparisons ($p < 0.05$) of soil and lettuce shoot contamination. Differences in snail growth rates and trace metal assimilation fluxes were judged from the absence of overlap of their 95% confidence intervals (95% CI).

All statistics were performed using R 2.10.1 (**R Development Core Team, 2011**).

3.4. RESULTS

3.4.1. EFFECT OF SS APPLICATION ON SOIL

The effects of SS on TMs concentrations in soil at the end of the experiment are shown in **Table 33**. After 28 days of exposure, the soil concentrations of Cu, Zn, Pb and Cd increased with SS addition. Although variations were not significant at the lowest application rate (AS 3), large increases were observed for Cu, Zn and Cd at the highest rate of SS application (8, 2.3 and 3 times higher respectively). For Pb, the enrichment was lower (1.3 times), but the difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Tableau 33 : Mean (\pm SD) TMs concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) in control soil (CS) and amended soil (AS) with 3, 30 and 60 Mg DW ha^{-1} ($n=3$). For each metal, values that share similar letters are not significantly different ($p < 0.05$).

	Cu	Zn	Pb	Cd
	($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)			
CS	14.2 \pm 2.5 ^a	39.3 \pm 2.5 ^a	15.6 \pm 0.6 ^a	0.06 \pm 0.01 ^a
AS 3	22.1 \pm 1.9 ^a	40.3 \pm 1.1 ^a	16.9 \pm 1.9 ^{ab}	0.07 \pm 0.01 ^a
AS 30	84.1 \pm 9.9 ^b	73.0 \pm 6.6 ^b	18.7 \pm 1.4 ^{bc}	0.13 \pm 0.01 ^b
AS 60	114.2 \pm 19.9 ^c	89.7 \pm 11.3 ^c	20.9 \pm 3.1 ^c	0.19 \pm 0.04 ^c

3.4.2. EFFECT OF SS APPLICATION ON LETTUCE

Visual observations showed a marked effect of SS application on lettuce growth (**Fig. 93**). Higher rates (30 and 60 Mg ha^{-1}) of SS increased the plants growth while the CS and AS 3 affected negatively this growing.



Figure 93 : Lettuce plants grown on soil amended with increasing doses of sewage sludge (A: 0 (control), B: 3, C: 30 and D: 60 Mg DW ha⁻¹). The effect of SS on lettuce growth can be seen in differences of the development of the above-ground parts in each treatment.

The concentrations of TMs measured in the lettuce leaves, for each treatment, are shown in **Table 33**. Cu and Pb concentrations did not show statistical differences between control and amended lettuce. However, the addition of SS increased the concentration of Zn in lettuce leaves, particularly when higher rates of SS were applied (30 and 60 Mg DW ha⁻¹). Zn concentration in AL 30 and AL 60 was 2 and 2.5 times higher respectively than in control lettuce. On the contrary, the lowest application rates (AL3) caused a significant raise of Cd leaf concentration compared to the CL, but no difference between CL and AL 30 or AL 60 was observed.

The protein contents of amended lettuces with higher SS application (30 and 60 Mg DW ha⁻¹) were comparable to results obtained from analyses of control lettuce (**Table 34**). Likewise, neither of both treatments altered the Mg concentrations in the leaves. Contrasting this, levels of these two parameters were lower in treated AL 3 lettuces. However, the Ca concentration in control lettuce is much higher than those in lettuce amended.

Tableau 34 : Mean (\pm SD) TMs concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW), mineral elements and protein (mg g^{-1} DW) in lettuce leaves used to feed *Cantareus aspersus* snails. Leaves were sampled from plants grown on soil control: Control Lettuce (CL) and amended soil: Amended Lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha⁻¹ (n=3). For each element, values that share similar letters are not significantly different ($p < 0.05$).

	Cu	Zn	Pb	Cd	Ca	Mg	Protein
	$(\mu\text{g g}^{-1} \text{ DW})$				$(\text{mg g}^{-1} \text{ DW})$		
CL	10.3 \pm 2.1 ^a	54.6 \pm 11.9 ^a	1.0 \pm 0.3 ^a	0.3 \pm 0.2 ^a	16.7 \pm 2.3 ^b	3.6 \pm 0.3 ^b	68.2 \pm 5.7 ^{ab}
AL 3	10.2 \pm 2.3 ^a	89.9 \pm 23.9 ^{ab}	1.1 \pm 0.2 ^a	1.1 \pm 0.3 ^b	09.2 \pm 0.2 ^a	2.3 \pm 0.2 ^a	53.3 \pm 5.3 ^a
AL 30	10.5 \pm 1.2 ^a	107.9 \pm 18.2 ^b	1.4 \pm 0.3 ^a	0.7 \pm 0.2 ^{ab}	10.1 \pm 0.9 ^a	3.5 \pm 0.3 ^b	71.6 \pm 3.2 ^{ab}
AL 60	11.1 \pm 0.6 ^a	138.8 \pm 26.3 ^b	1.1 \pm 0.4 ^a	0.5 \pm 0.1 ^{ab}	10.4 \pm 0.7 ^a	3.9 \pm 0.3 ^b	72.6 \pm 4.7 ^b

3.4.3. SNAIL MORTALITY AND GROWTH

Only 7 snails (about 4 %), distributed among the various treatments, died during period exposure. The biomass (fresh and dry matter) (**Fig. 94a and 94b**) of snails exposed to AS and fed with AL increased significantly compared to snails in CSCL modality. However, the difference between CSCL and ASCL was smallest. Although the fresh matter of the snails in CSCL and ASCL 60 increased significantly during time of exposure ($p=0.003$ for both), the dry matter was not affected ($p=0.321$ and $p=0.753$ respectively). The highest growth rates were detected in ASAL 30 (0.0051 and 0.0457 g day⁻¹ for dry and fresh matter respectively). **Fig. 95** shows the relationship between (a) shell diameter vs. fresh mass and (b) shell

diameter vs. shell mass. The main result of these analyses was that there were high significant ($p < 0.0001$) positive relationships between shell diameter and fresh mass in snails of ASAL 30 and ASAL 60 ($R^2 = 0.46$ and $R^2 = 0.34$ respectively), and between shell diameter and shell mass only in snails of ASAL 30 ($R^2 = 0.34$).

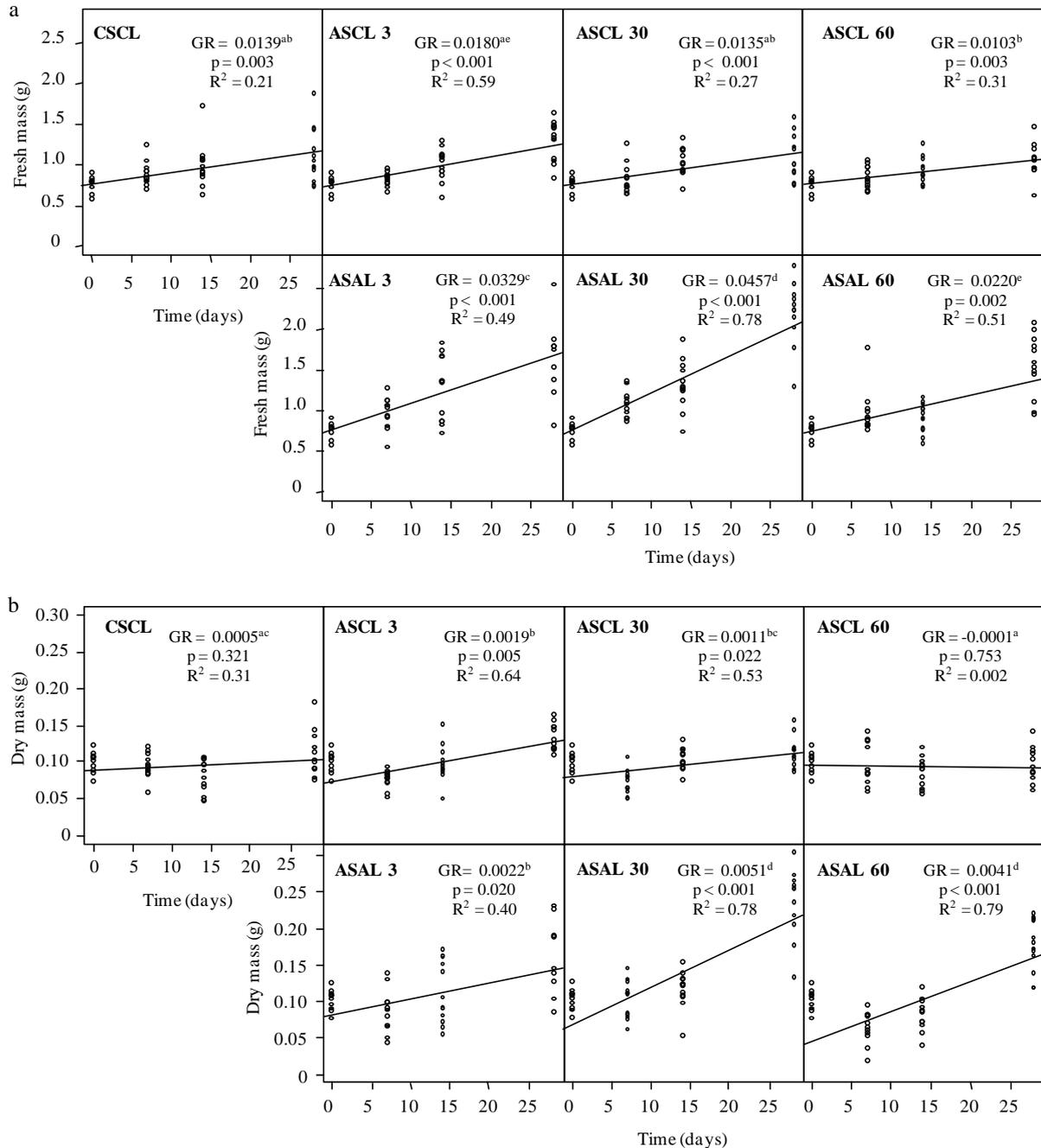


Figure 94 : Fresh (a) and dry (b) weight of the whole soft bodies of exposed *Cantareus aspersus* to control (CS) or amended soil (AS) and fed with control (CL) or amended lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha⁻¹. GR: Estimated growth rate (g snail⁻¹ d⁻¹) for n=3 with 4 sub-replicates. GR values that share similar letters are not significantly different ($p < 0.05$). In the same treatment, p indicates the result of statistical test during exposure period (0, 7, 14, 28 days).

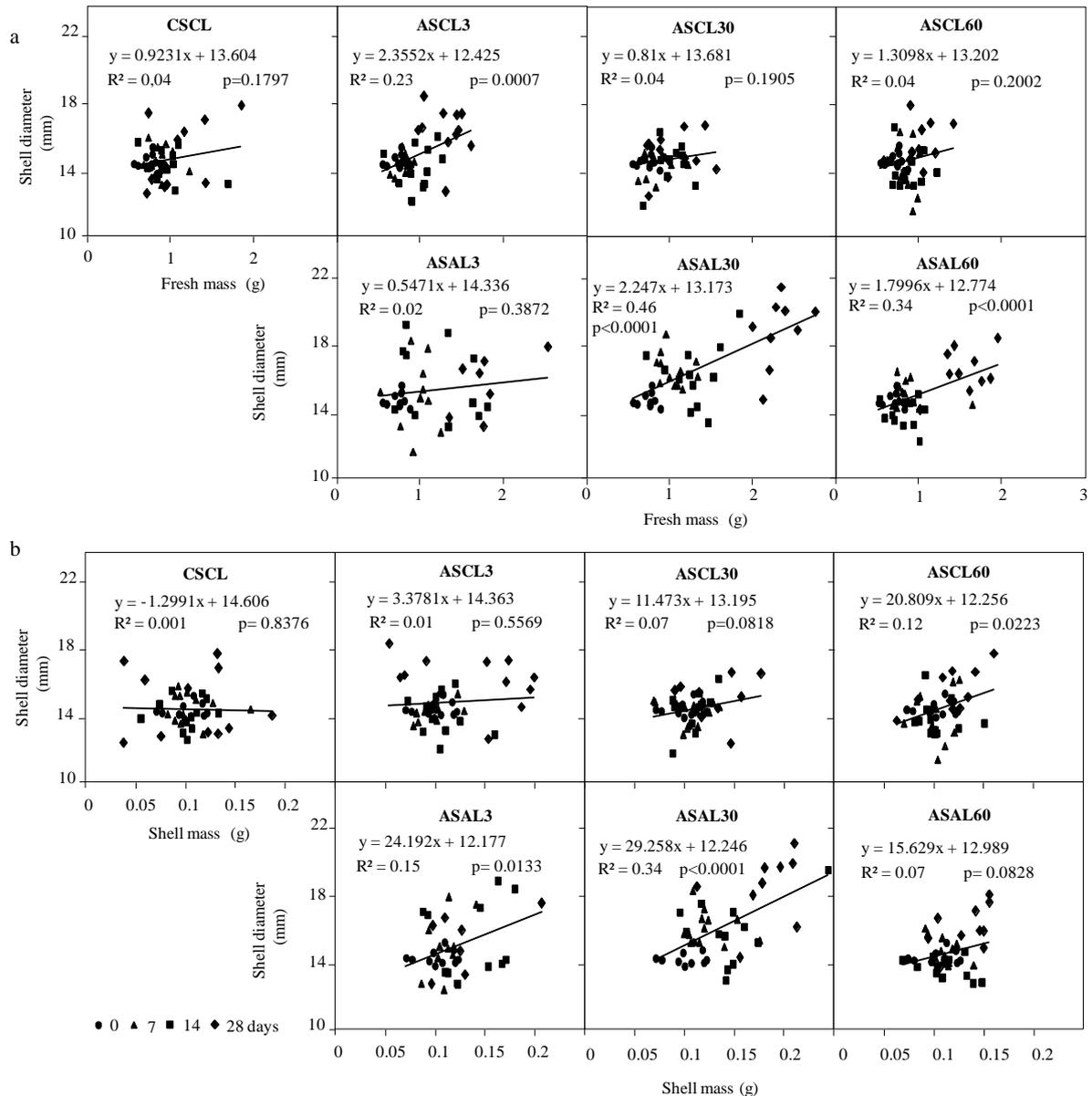


Figure 95 : Relationships between shell diameter (mm) with (a) fresh mass (g) of the whole soft bodies or with (b) shell mass (g) of *Cantareus aspersus* during exposure to control (CS) or amended soil (AS) and fed with control (CL) or amended lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha⁻¹. In the same treatment, p indicates the result of statistical test during exposure period (0, 7, 14, 28 days).

3.4.4. SNAIL BIOACCUMULATION OF ESSENTIAL ELEMENTS (Cu & Zn)

For Cu, no accumulation was detected at CSCL and ASCL 3 ($p=0.469$ and $p=0.127$ respectively) and no significant differences were observed between these two modalities (**Fig. 96a**). However, there were significant increases in snail contents when these animals were exposed to ASCL 30 and ASCL 60 and to different rates of ASAL (3, 30 and 60). In the case of Zn (**Fig. 96b**), amended soil (AS) with different rates of SS did not cause any accumulation of this metal in the whole soft body of *C. aspersus* during the experiment. Similar results were also found in ASAL 3 modality, but, the assimilation fluxes (a) of snails exposed to ASAL 30 and ASAL 60 increased significantly ($p=0.03$ and $p=0.05$ respectively). The maximum Cu and Zn assimilation fluxes were observed in the same modality: ASAL 30 ($a=0.627$ and $a=0.715 \mu\text{g day}^{-1}$ respectively).

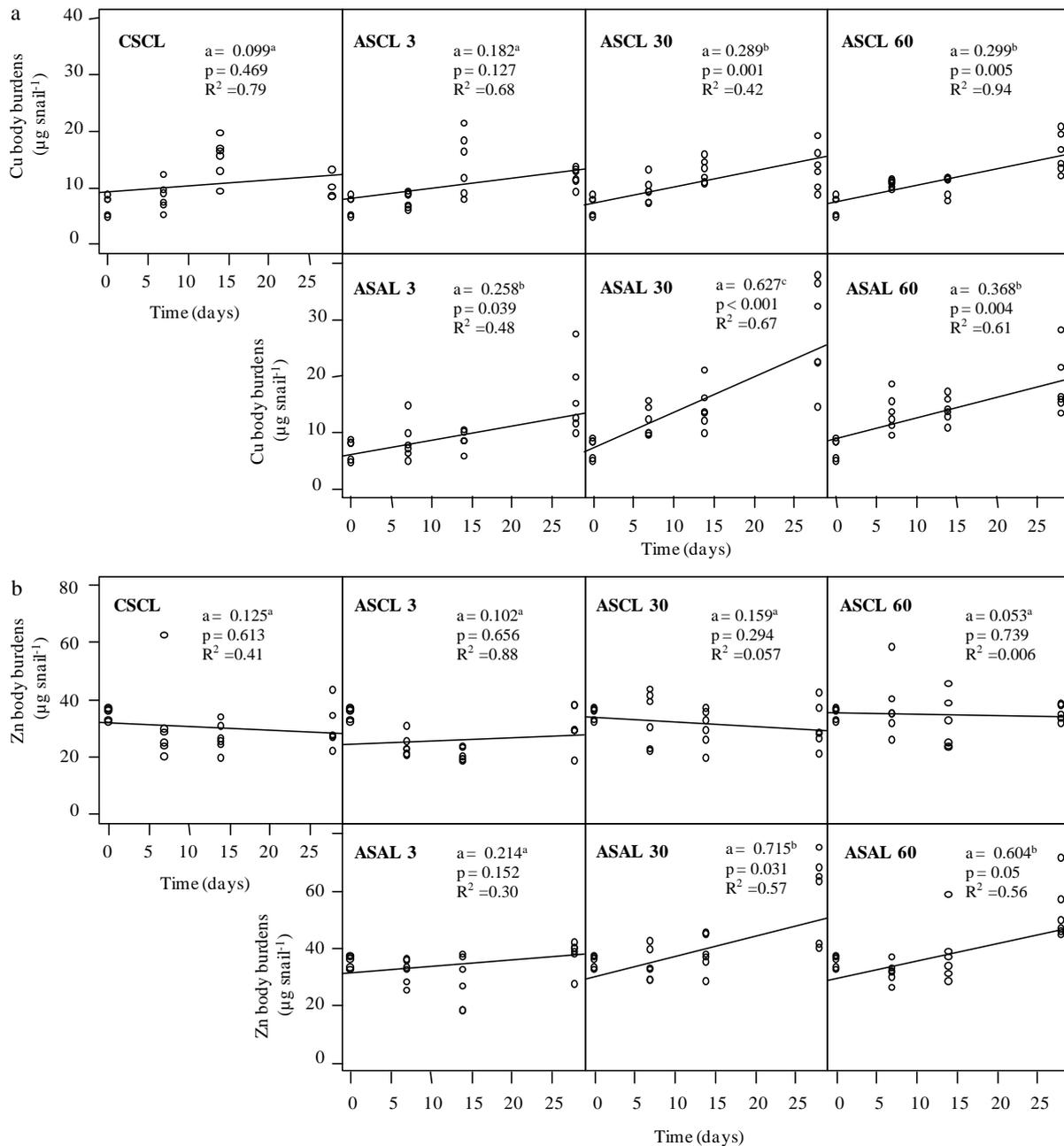


Figure 96: Total contents ($\mu\text{g snail}^{-1}$) of essential elements: (a) Cu and (b) Zn calculated in the whole soft bodies of exposed *Cantareus aspersus* to control (CS) or amended soil (AS) and fed with control (CL) or amended lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha^{-1} . a = assimilation fluxes ($\mu\text{g}_{\text{metal}} \text{snail}^{-1} \text{d}^{-1}$) for $n=3$ with 2 sub-replicates. Values that share similar letters are not significantly different ($p<0.05$). In the same treatment, p indicates the result of statistical test during exposure period (0, 7, 14, 28 days).

3.4.5. SNAIL BIOACCUMULATION OF NON-ESSENTIAL METALS (Pb & Cd)

Accumulation of Pb in soft body snails versus time for different modalities is showed in **Fig. 97a**. Generally, the Pb content increased slightly during exposure at the CSCL, but there was no significant difference between 0 and 28 days of exposure ($p=0.054$). Similar results were obtained when snails were exposed to two potential sources of contamination amended with higher rates of SS (30 and 60). However, a statistically significant increase of Pb content in snails exposed to different rates of amended soils (3, 30 and 60) and fed with control or

amended lettuce (AL 3). In contrast to other elements such as Cu, Zn and Pb, Cd contents increased significantly in all treatments (Fig. 97b). The assimilation fluxes of CSCL and ASCL 3 were similar between them, but in other modalities, the values of assimilation fluxes were significantly higher comparing to the first ones. The highest accumulation fluxes were observed in ASCL 3 and ASAL 3 modalities for Pb ($a=0.009 \mu\text{g day}^{-1}$), and only in ASAL 3 treatment for Cd ($a=0.014 \mu\text{g day}^{-1}$).

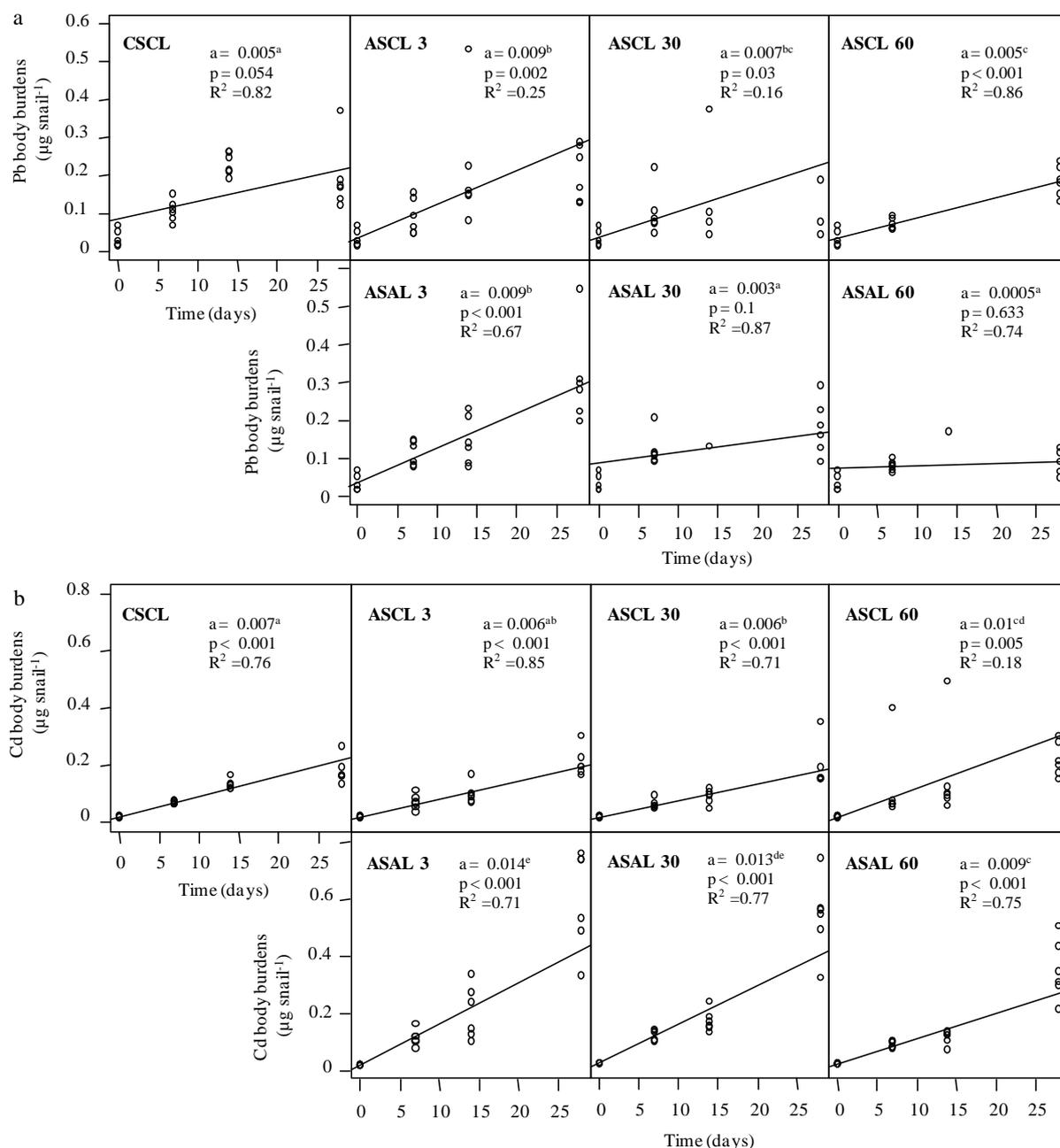


Figure 97 : Total contents ($\mu\text{g snail}^{-1}$) of non-essential elements: (a) Pb and (b) Cd calculated in the whole soft bodies of exposed *Cantareus aspersus* to control (CS) or amended soil (AS) and fed with control (CL) or amended lettuce (AL). Three rates of SS were applied: 3, 30 and 60 Mg DW ha⁻¹. a= assimilation fluxes ($\mu\text{g metal snail}^{-1} \text{d}^{-1}$) for n=3 with 2 sub-replicates. Values that share similar letters are not significantly different ($p < 0.05$). In the same treatment, p indicates the result of statistical test during exposure period (0, 7, 14, 28 days).

3.5. DISCUSSION

3.5.1. EFFECTS OF SS ON LETTUCE AND SNAIL GROWTH

The high quantities of SS provided more nutrients to the lettuce plants, which promotes primary growth and biomass increase. Improved growth of lettuce plants with SS application has been reported by **Munir and Bayan (2004)** and attributed, particularly, to the increase of N and P in soil. Thus, the negative effect on growth in soil control and low rate of SS application is likely related to the nutrient deficiency. For snails, no mortality and no toxic effects were detected during exposure. Further, there were positive effects on selected growth parameters (dry and fresh mass, shell mass and shell diameter) when snails were exposed to the combined potential sources of contamination. This stimulatory effect was more pronounced at high rates of sludge application. Very few studies have been carried out on the snail effect of sludge application. In particular, **Scheifler et al. (2003)** reported the absence of measured effects on *C. aspersus* (mortality and growth) of sludge amendment *in situ* at a rate of 3 Mg DW ha⁻¹ (In agreement with French Order dated 8 January 1998 setting the technical regulations that apply to spreading of sludge on agricultural land). The impact of sludge on other snail species was also studied. As our results, **Kurihara and Kadowaki (1988)** showed that the application of composted sludge at submerged paddy soil increased in both number and growth of *Cipangopaludina japonica*, which due to algal detritus and bacterial materials increase after sludge spreading.

Since all snails were received the same lettuce amount in this experiment, the first hypothesis explained the higher growth performance favoured by sludge implies the nutritive value of lettuce leaves. Thus, this increased growth rate of snails exposed to SS might be explained by high nutritional quality of lettuce leaves, in particular, the presence of promoting growth factors. This precipitated our interest in investigating a lettuce calcium, magnesium and protein contents. However, the present results suggest that other nutritional factors likely act. **Xu et al. (2005)** showed that quality of the leafy vegetables was improved when these vegetables grown with organic fertilizers, which was indicated by high concentrations of sugars and vitamin C. These authors did not consider only the nutrients but also the harmful compounds such as nitrate content, which was significantly lower in organic-fertilized than chemical-fertilized vegetables. The other hypothesis was related to the hormesis effect of TM contents (discussed below). Indeed, it is quite clear that the toxic elements in SS were not high enough to generate negative responses. It is well known that some metals have the beneficial effects at low doses (**Marigomez et al., 1986**). However, it must be emphasized that this phenomenon presents two major difficulties i) the stimulation of one parameter, growth in our case, can compromise the other parameters. In fact, the energy allocated to a stimulated parameter may be at the expense of another parameter (**Cedergreen, 2007**), which makes it difficult to evaluate hormesis effect as beneficial or harmful for ecological systems; ii) the mechanisms of action are less known, which impede to fully consider this in ecological risk assessment (**van der Woude et al., 2005**). Large uncertainties arising from these difficulties led **Gentile and van der Schalie (2000)** to point that this effect is a critical factor in most ecological risk assessments.

3.5.2. METAL INPUTS IN AMENDED SOIL AND THEIR BIOAVAILABILITY TO LETTUCE AND SNAIL COMPARTMENTS

The addition of higher doses of SS causes an increase in the concentrations of TMs in the surface layer of the soil. However, the low doses did not cause a significant increase in TM concentrations. Similar results were obtained by **Mantovi et al. (2006)** and recently by **Lottermoser (2012)**. In case of the highest SS application (60 Mg ha^{-1}), only the concentration of Cu was above the maximum value permissible by French regulations for agricultural soils receiving SS.

The TM content of a plant depends on the amount of their bioavailable fraction to the plant, which is strongly influenced by soil pH, cation exchange capacity, organic matter, mobility and speciation of each metal (**McBride, 2003**). In general, the largest enrichment of soil amended occurs for all TMs studied. Leaf Zn content ranged from 54.64 to $138.8 \mu\text{g g}^{-1}$ DW in different treatments, but this level is required for normal plant growth ($25\sim 150 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) (**Myung, 2008**). However, a significant positive relationship between leaf and soil Zn concentrations was shown. This result agrees with data commonly found in literature, which usually demonstrates the elevated assimilation due to high availability of Zn (**Moffett et al., 2003**). Indeed, the greater fraction of exchangeable Zn may be the result of lower adsorption of Zn on organic matter in acidic soils (**Basta et al., 2005**). For the other metals, the lettuce uptake is not affected by total content of the soil. This is probably due to the OM content of SS, which should restrict their solubility (**Roy and Couillard, 1997; Kim and McBride, 2006**). **Elliott et al. (1986)** indicates that the order of adsorption selectivity for soils rich in OM was $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$, suggesting that OM increased Pb retention preferentially over that other metals. On the other hand, a major portion of Pb is bound to the cell walls and deposited in apoplast region (**Tung et Temple, 1996**). Subsequent research on Cd applied in biosolids has shown that when high-quality (low Cd and low Cd:Zn ratio) biosolids were applied, crop Cd was only marginally increased (**Chaney et al., 1978**). In fact, high soil Zn concentration has been reported to decrease Cd uptake by a variety of plant species (**Kukier and Chaney, 2002**).

Numerous studies have shown that snails have the capacity to accumulate TMs at high levels in their tissues (**Laskowski and Hopkin, 1996a, 1996b ; Gomot-De Vaufleury and Kerhoas, 2000 ; Swaileh and Ezzughayyar, 2000 ; Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2002**). TMs are transferred to snails by digestive tract (soil, litter and plant) and, to a lesser extent, by dermal exposure (**Dallinger et al, 2001; Coeurdassier et al., 2002; Marigomez, et al., 2002**). However, their accumulation is the result of biological behaviors that affect the kinetics of these metals; that is, differences in rate of absorption and assimilation (**Notten et al., 2006a; Gimbert et al., 2008**). The high contents of Cu and Zn found in the soft body of *C. aspersus* may be related to the importance of this metal in the metabolic functions since these two metals are essentials. Their levels found in snails exposed to two contamination sources (soil and food) with high SS rates were positively correlated with biomass increase. This is also the case for Cd, although it is non-essential metal. The different exposure modalities indicated that the importance of both transfer sources differed per metal investigated. Pb behavior in soil-plant compartments discussed above suggested that soil is the most important transfer source for this metal. Thus, the high quality of lettuce leaves (AL

30 and AL 60) previously supposed provides the nutritional needs of snails, which limits the metal transfer from the soil to the snails. Therefore, the Cu, Zn and Cd assimilation by snails were mainly the result of transfer from amended lettuce leaves to snails. It has been found that the soil contribution to Pb assimilation by snails was higher than 80 % (**Scheifler et al., 2006**). Similarly, a recent study revealed that 89.9 % of Pb assimilated was transferred directly via the soil (**Pauget et al., 2012**). In the same study, this author estimated the contribution of lettuce to the total Cd assimilation at 68.1 %. In the current study, Cu and Cd concentrations in lettuce leaves were similar. Thus, snail assimilation needs to consider speciation and the manner in which these metal species are handled within cells. **Monteiro et al. (2008)** examined the sub-cellular distribution of Cd in lettuce and demonstrated that only a small proportion of metal (22.4 %) was bound with phytochelatins or metallothionein. These authors showed that this fraction had a weak bioavailability (22.8 %) to isopod (*Porcellio dilatatus*). As noted by **Krämer and Clemens (2005)**, the metal homeostasis system controls very tightly the availability of metal ions in the cell, and in the presence of quite high quantity of each metal ion, a competition for the cell wall binding sites may occur with other metal species present in low concentrations. This suggest that the great Zn content can displace or compete for the binding sites with Cu and Cd, which make them also more available in the cells in free forms. Zinc ion is a strong Lewis acid, inferior only to Cu^+ and Cu^{2+} among the transition metal and it exhibits high binding affinity (**Krämer and Clemens, 2005**). For Cd, it appears that the similarity between Cd and Zn in their electronic structure plays an important role in this interaction.

3.6. CONCLUSION

This study brings original data on the sludge effects on *C. aspersus* snail and shows that transfer of TMs occurred, while no toxic effects were detected. However, there is little published data of their effects under real conditions of application particularly on forest ecosystems, which offer a solution to the problem of final disposal of SS. In fact, these promising results on trophic chain effects should be interpreted carefully, because for efficient assessment of sludge amendment effects, we must adopt also an approach to predict the long-term impacts on snails as well as other species models.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to French Agency for Environment and Energy Management (ADEME-France), the Regional Council (Conseil régional) of Franche-Comté, and the Water Agency Rhône-Méditerranée & Corse (Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée & Corse) for financial support.

3.7. REFERENCES

- Basta, N.T., Ryan, J.A., Chaney, R.L., 2005. Trace Element Chemistry in Residual-Treated Soil: Key Concepts and Metal Bioavailability. *J. Environ. Qual.* 34, 49-63.
- Carbonell, G., Pro, J., Gomez, N., Babin, M.M., Fernandez, C., Alonso, E., Tarazona, J.V., 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1309-1319.
- Cedergreen, N., Streibig, J.C., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Duke S.O., 2007. The Occurrence of Hormesis in Plants and Algae. *Dose Response* 5, 150-162.
- Chaney, R.L., Stoewsand, G.S., Bache, C.A., Lisk, D.J., 1978. Cadmium deposition and hepatic microsomal induction in mice fed lettuce grown on municipal sludge-amended soil. *J. Agr. Food Chem.* 26, 992-994.
- Coeurdassier, M., Gomot-de Vauflery, A., Lovy, C., Badot, P.-M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotox. Environ. Safe.* 53, 425-431.
- Couillard, D., Grenier, Y., 1989. Effect of applications of sewage sludge on N, P, K, Ca, Mg and trace element contents of plant tissues. *Sci. Total Environ.* 80, 113-125.
- Dallinger, R., Berger, B., Triebkorn-Köhler, R., Köhler, H., 2001. Soil biology and ecotoxicology, in: Barker, G.M. (Ed.), *The biology of terrestrial molluscs*. CAB International, Wallingford, pp. 489-525.
- Elliott, H.A., Liberati, M.R., Huang, C.P., 1986. Competitive adsorption of heavy metals by soils. *J. Environ. Qual.* 15, 214-219.
- Gentile, J.H., van der Schalie, W.H., 2000. Hormesis and ecological risk assessment: fact or fantasy? *Hum. Ecol. Risk Assess.* 6, 227-236.
- Gimbert, F., Vijver, M.G., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Peijnenburg, W.J.G.M., Badot, P.-M., de Vauflery, A., 2008. How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1284-1292.
- Gimbert, F., de Vauflery, A., 2009. Bioindication and units (concentrations vs body burdens): comparison of Cd, Pb and Zn accumulation and elimination kinetics in *Helix aspersa* snails. *Etude et Gestion des Sols* 16, 243-252.
- Gomot-de Vauflery, A., Kerhoas, I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *B. Environ. Contam. Tox.* 64, 434-442.
- Gomot-de Vauflery, A., Pihan, F., 2002. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 820-827.

- Grafen, A., Hails, R., 2002. *Modern Statistics for the Life Sciences*: Oxford University Press. 351 p.
- ISO 15952, 2006. Soil quality. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Standardisation Organisation? Geneva, Switzerland.
- Kim, B., McBride, M.B., 2006. A test of sequential extractions for determining metal speciation in sewage sludge-amended soils. *Environ. Pollut.* 144, 475-482.
- Krämer U., Clemens, S., 2006. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In M Tamás, E Martinoia, eds, *Topics in Current Genetics* 14. Springer, Heidelberg, pp. 215-271.
- Kukier, U., Chaney, R.L., 2002. Growing rice grain with controlled cadmium concentrations. *J. plant nutr.* 25, 1793-1820.
- Kurihara, Y., Kadowaki, K.-I., 1988. Effect of different ecological conditions on the mud snail (*Cipangopaludina japonica*) in submerged paddy soil. *Biol. Fert. Soils* 6, 292-297.
- Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996a. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): implications for predators. *Environ. Pollut.* 91, 289-297.
- Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996b. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotox. Environ. Safe.* 34, 59-69.
- López-Mosquera, M.E., Cascallana, V., Seoane, S., 2002. Comparison of the effects of dairy sludge and a mineral NPK fertilizer on an acid soil *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 17, 87-99.
- Lottermoser, B.G., 2012. Effect of long-term irrigation with sewage effluent on the metal content of soils, Berlin, Germany. *Environ. Geochem. Health* 34, 67-76.
- Mantovi, P., Baldoni, G., Dalre, L., Piccinini, S., Rossi, L., 2006. Effects of 15 years sludge application on cropland. In: *sludge disposal; proceeding book of IWA conference of sludge management*, Moscow, Sec. 10, 10-16.
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Techniq.* 56, 358-392.
- Marigomez, J.A., Angulo, E., Saez, V., 1986. Feeding and growth responses to copper, zinc, mercury and lead in the terrestrial gastropod *Arion ater* (linne). *J. Moll. Stud.* 52, 68-78.
- McBride, M.B., 2003. Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? *Adv. Environ. Res.* 8, 5-19.
- MEEDDAT (Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de l'Aménagement du Territoire), 05 mai 2009. *Éléments de contexte et réglementation française relatifs à la valorisation des boues issues du traitement des eaux usées.*

- http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/DGALN_-_090504_lpdi_boue_synthese_internet_francais_v1.pdf (accessed 22 January 2013).
- Moffett, B.F., Nicholson, F.A., Uwakwe, N.C., Chambers, B.J., Harris, J.A., Hill, T.C.J., 2003. Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 13-19.
- Monteiro, M., Santos, C., Soares, A.M.V.M., Mann, R.M., 2008. Does subcellular distribution in plants dictate the trophic bioavailability of cadmium to *Porcellio dilatatus* (Crustacea, Isopoda)? *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 111-119.
- Munir, J.M., Bayan, M.A., 2004. Changes in soil fertility and plant uptake of nutrients and heavy metals in response to sewage sludge application to calcareous soils. *J. Agron.* 3, 229-236.
- Myung, C.J., 2008. Heavy metal concentrations in soils and factors affecting metal uptake by plants in the vicinity of a Korean Cu-W mine. *Sensors* 8, 2413-2423.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2006. The landsnail *Cepaea nemoralis* regulates internal Cd levels when fed on Cd-enriched stinging nettle (*Urtica dioica*) leaves at low, field-relevant concentrations. *Environ. Pollut.* 139, 296-305.
- Pauget, B., 2012. How contamination sources and soil properties can modify the metal bioavailability to snail, *in* détermination des facteurs modulant l'accumulation et la biodisponibilité des métaux pour l'escargot. PhD Franche-Comté University.
- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*, Springer.
- R Development Core Team, 2011. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- Rosa, E.V.C., Giuradelliy, T.M., Correa, A.X.R., Rorig, L.R., Schwingel, P.R., Resgalla, J. C., Radetski, C.M., 2007. Ecotoxicological evaluation of the short term effects of fresh and stabilized textile sludges before application in forest soil restoration. *Environ. Pollut.* 146, 463-469
- Roy, M., Couillard, D., 1997. Use of municipal sewage sludge for the fertilization of forests. Mobility of metals and the risk of surface- and ground-water contamination. *Revue des sciences de l'eau* 4, 507-525.
- Scheifler, R., BenBrahim, M., Gomot-de Vaufleury, A., Carnus, J.-M., Badot, P.-M., 2003. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environ. Pollut.* 122, 343-350.
- Scheifler, R., de Vaufleury, A., Coeurdassier, M., Crini N., Badot, P.M., 2006. Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 815-822.

- Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Toussaint, M.-L., Badot, P.-M., 2002. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48, 571-579.
- Singh, R.P., Agrawal, M., 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Manag.* 28, 347-358.
- Swaileh, K., Ezzughayyar, A., 2000. Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotox. Environ. Safe.* 47, 253-260.
- Tung, G., Temple, P.J., 1996. Histochemical detection of lead in plant tissues. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 906-914.
- Van Der Woude, H., Alink, G.M., Rietjens, I.M., 2005. The definition of hormesis and its implications for in vitro to in vivo extrapolation and risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 603-607.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A., Lano, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J., 2004. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4705-4712.
- Xu, H.L., Wang, R., Xu, R.Y., Mridha, M.A.U., Goyal, S., 2005. Yield and quality of leafy vegetables grown with organic fertilizations. *Acta Hort.* 627, 25-33.

CONCLUSION GENERALE

&

PERSPECTIVES

Les boues de STEP sont valorisées en grande partie par les systèmes agricoles en tant que source de nutriments. Toutefois, la présence de divers polluants, en particulier les ETM, dans les boues résiduaires demeure l'obstacle majeur à leur valorisation. Bien que cette pratique soit strictement réglementée, elle expose l'homme à un risque de contamination directe par ces substances toxiques omniprésentes dans les boues. Certes, l'épandage des boues en milieu forestier diminue ces risques directs de contamination de la chaîne alimentaire humaine. Cependant, les études sur l'évaluation des impacts sur l'écosystème forestier sont très limitées. Avant de proposer cette alternative aux usagers comme outils de fertilisation des sols forestiers pauvres, il est indispensable d'analyser les effets bénéfiques et préjudiciables des boues épandues dans l'écosystème forestier, ce qui a constitué l'objectif de cette thèse. Cette étude a permis d'évaluer, à court et moyen terme, les bénéfices et les risques de l'apport des boues sur quatre composantes de l'écosystème forestier (sol, eau, flore, faune) qui a nécessité une approche pluridisciplinaire. L'apport des boues a montré (i) un enrichissement de l'horizon supérieur en azote et en phosphore mais également en ETM, (ii) une amélioration de la production chez les jeunes mélèzes suite à l'amélioration d'abord du statut nutritionnel et plus spécifiquement celui de l'azote et du phosphore puis à l'augmentation de la performance de l'assimilation photosynthétique. L'analyse du compartiment aquatique a montré (iii) une faible lixiviation du nitrate uniquement à 20 cm alors que celle de la nappe n'a montré aucune contamination. Cependant, l'exposition de *Lemna minor* aux lixiviats bruts montre une stimulation de la croissance dans le cas de l'apport de 60 t MS ha⁻¹ et constituerait donc un risque d'eutrophisation en cas de lixiviation intense. L'évaluation des risques de l'épandage sur le (iiii) réseau trophique ne montre aucune augmentation significative du taux de transfert des ETM vers les escargots. Néanmoins, la quantité des ETM accumulés dans le corps mou augmente significativement suite à la stimulation de la croissance des escargots. Cette stimulation inattendue et très marquée dans le cas d'une double exposition (sol amendé et laitue exposée) pourrait être due à une meilleure qualité nutritive de la laitue exposée à 30 t MS ha⁻¹ et à 60 t MS ha⁻¹.

Ces résultats devraient être interprétés avec prudence. D'une part, ils sont propres à un contexte climatique et forestier précis et dépendent de plusieurs paramètres : type de boues, type de sol, climat, dose épandue, essence forestière et âge du peuplement. D'autre part, il faut souligner que la situation sur le terrain présente un risque d'accumulation des éléments plus élevé lié aux épandages répétés des boues. Les apports de 30 et 60 t MS ha⁻¹, réalisés en conditions contrôlées, ont montré peu de différence pour la plupart des paramètres suivis, ainsi, la dose 30 t MS ha⁻¹ est suffisante pour introduire un effet bénéfique sur ces paramètres. L'application de la dose maximale 60 t MS ha⁻¹ est à exclure du fait de l'absence d'une amélioration supplémentaire de la productivité et surtout des trop grandes quantités des ETM qu'elle introduit dans le milieu naturel. Ces éléments peuvent créer des problèmes de contamination des eaux, même si durant cette expérimentation, ils ont été immobilisés en grande partie dans l'horizon supérieur. Par ailleurs, les quantités importantes de ces éléments dans le sol de surface après un seul apport ne permettent pas d'envisager des épandages successifs aux doses étudiées.

Perspectives

Les besoins nutritionnels varient d'une espèce à l'autre, le cahier de charge de l'opération épandage doit en tenir compte en plus du contexte pédologique (type de sol, pH ...). Toutefois, une des situations qui s'apprête techniquement à l'épandage des boues est les plantations de taillis à courte rotation (TCR) ou très courte rotation (TtCR). En effet, le bois d'énergie présente un intérêt indéniable en tant que combustible pour la lutte contre le changement climatique et la production d'énergie renouvelable. De plus, ces plantations présentent un modèle simple, comme c'est le cas dans le domaine agricole (un sol, une culture), pour modéliser les épandages en fonction des besoins nutritifs des arbres. Cependant, ces plantations monospécifiques soulèvent d'autres problématiques d'ordre environnemental : perte de biodiversité, dégradation des sols et banalisation des paysages. L'étude des transferts des ETM à travers la chaîne alimentaire doit être poursuivie à long terme et étendue à la microfaune, la mésofaune et la faune sauvage des zones étudiées.

Pour finir, la biosurveillance de placettes exploitées par épandage devrait également tenir compte des autres polluants, qualifiés d'émergents tels que certains stéroïdes, des substances médicamenteuses à usage humain ou vétérinaire, des produits de dégradation de détergents non ioniques (composés du nonyl- et octyl-phénol), des phtalates, des nanoparticules etc. qui sont également présents dans les boues.

ANNEXES

Annexe 1 : Législation flamande (Smit, 1998 cité par Baize et Tercé, 2002)

Tableau 1 : « Valeurs de référence » d'échantillons de sols standards légalement adoptées en Flandre (mg Kg⁻¹ de MS). Le sol standard contient 10% d'argile et 2 % de matières organiques.

Eléments	Valeurs de référence	Eléments	Valeurs de référence
As	19	Hg	0,55
Cd	0,8	Ni	9
Cr	37	Pb	40
Cu	17	Zn	62

Tableau 2 : Equation pour calculer la valeur de référence pour des sols non standards (Flandre).

$$VR = VR(\text{sol standard}) \times \frac{A + xB + yC}{A + 10B + 2C}$$

x = taux d'argile en %.

y = taux de matières organiques en %.

Eléments	A	B	C	Eléments	A	B	C
As	14	0,5	0	Hg	0,5	0,0046	0
Cd	0,4	0,03	0,05	Ni	6,5	0,2	0,3
Cr	31	0,6	0	Pb	33	0,3	2,3
Cu	14	0,3	0	Zn	46	1,1	2,3

Ainsi, pour un sol contenant 40 % d'argile et 4 % de matières organiques, on devra multiplier la valeur du sol standard pour Ni= 9 par :

$$\frac{6,5 + (40 \times 0,2) + (0,3 \times 4)}{6,5 + (10 \times 0,2) + (0,3 \times 2)} = \frac{15,7}{9,1} = 1,725 \text{ soit } 15,5$$

Tableau 3 : Valeurs seuils de réhabilitation des sols, adoptées en Flandre en fonction de l'usage envisagé du site réhabilité (en mg kg⁻¹ de sol standard sec)

Eléments	Parc naturel	Agriculture	Zones résidentielles	Zones de récréation	Zones industrielles
As	45	45	110	200	300
Cd	2	2	6	15	30
Cr	130	130	300	500	800
Cu	200	200	400	500	800
Hg	10	10	15	20	30
Ni	100	100	470	550	700
Pb	200	200	400	1500	2500
Zn	600	600	1000	1000	3000

Annexe 2 : Législation aux Pays-Bas (Smit, 1998 cité par Baize et Tercé, 2002)

Tableau 1: Valeurs cibles néerlandaises pour les éléments traces pour quelques types de sols. Valeurs en mg kg⁻¹ de MS :

Eléments	Equation	Sol standard	Sol sableux	Sol argileux
		A=25 ; H=10	A=3 ; H=2	A=30 ; H=5
As	$15 + 0,4(A + H)$	29	17	29
Cd	$0,4 + 0,007(A + 3H)$	0,80	0,46	0,71
Cr	$50 + 2A$	100	56	110
Cu	$15 + 0,6(A + H)$	36	17	36
Hg	$0,2 + 0,0017(2A + H)$	0,30	0,21	0,31
Ni	$10 + A$	35	13	40
Pb	$50 + (A+H)$	85	55	85
Zn	$50 + 1,5(2A + H)$	140	62	147,5

A = % de particules inférieures à 2 µm ; H = % de matières organiques.

Remarque :

- Le « sol standard » des Pays-Bas est vraiment très riche en matières organiques (10 %) ;
- Les matières organiques ne jouent aucun rôle vis-à-vis de Cr et du Ni ;
- Si on applique ces « valeurs cibles » à des sols argileux de Bourgogne contenant 40 % d'argile, on obtient une valeur cible pour le Ni de 50 mg kg⁻¹.

Tableau 2: « Valeurs signal » néerlandaises pour les éléments traces dans les sols agricole (en mg kg⁻¹ MS)

Eléments	Sols sableux et tourbes assainies					Sols argileux et tourbes				
	1A	1B	2	3	4	1A	1B	2	3	4
As	30	30	30	30	30	50	50	50	50	50
Cd	2	2	0,5	0,5	5	3	3	1	1	10
Cr	200	200	200	200	200	300	300	300	300	300
Cu	30	50	50	50	50	30	80	80	200	200
Hg	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ni	150	150	150	150	150	150	150	150	200 ⁽¹⁾	800
Pb	15	15	15	15	15			50 ou 70 ⁽²⁾		
Zn	200	200	100	100	100	350	350	350	350	350

1A : prairie pâturée par des moutons ;

1B : prairie pâturée par des bovins ;

2 : terrain labouré pour plantes fourragères ;

3 : terrain labouré pour des plantes alimentaires, jardins ouvriers ;

4 : terrain labouré pour cultiver des plantes d'ornement.

⁽¹⁾ : cette valeur doit être avancée avec précaution car les données manquent sur les retombées atmosphériques du Pb. Ces retombées peuvent faire croître la teneur en Pb de la plante, sans aucune intervention du sol.

⁽²⁾ : 50 mg kg⁻¹ pour les sols argileux et 70 mg kg⁻¹ pour les tourbes.

Annexe 3 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution des paramètres du sol en fonction de la durée de culture (Rb : Résidus de boues, H> : horizon supérieur et H< : horizon inférieur des pots témoins (T), des pots amendés B1 (30 t MS ha⁻¹) et B2 (60 t MS ha⁻¹).

Horizons du sol		Rb					H>					H<				
Durée de culture (mois)		1,5	3	6	12	18	1,5	3	6	12	18	1,5	3	6	12	18
pH	T	-	-	-	-	-	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a
	B1	a	b	c	bc	b	a	b	a	b	b	ab	ab	a	b	ab
	B2	a	b	b	b	b	a	b	b	b	b	a	a	b	b	b
%N	T	-	-	-	-	-	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a
	B1	ab	a	b	a	c	a	a	a	a	a	ab	a	b	ab	a
	B2	ab	ab	a	b	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
P	T	-	-	-	-	-	-	a	b	c	d	-	a	b	c	bc
	B1	-	a	a	b	b	-	a	b	b	c	-	a	b	c	c
	B2	-	a	b	c	c	-	a	b	bc	d	-	a	b	b	b
K	T	-	-	-	-	-	a	bc	ab	ab	c	a	bce	cd	d	e
	B1	a	b	c	bc	d	a	bcd	cde	de	e	a	b	ab	b	b
	B2	a	ac	b	bc	d	a	a	b	ac	b c	a	a	a	a	b
Cu	T	-	-	-	-	-	a	b	a	ac	bc	a	b	a	a	c
	B1	a	a	a	b	c	a	a	b	b	b	a	b	a	ab	a
	B2	a	a	a	b	c	a	a	ab	ab	b	a	a	a	a	a
Zn	T	-	-	-	-	-	a	b	b	c	bc	a	b	c	b	b
	B1	a	b	a	c	c	a	bc	b	c	bc	a	ab	b	ab	ab
	B2	a	b	b	c	d	a	b	bc	ac	bc	a	ab	b	ab	ab
Pb	T	-	-	-	-	-	a	b	c	a	a	a	b	c	ac	ac
	B1	a	a	a	b	c	ab	c	a	ab	b	a	b	a	c	a
	B2	a	a	b	c	d	a	b	a	c	d	a	b	ad	c	d
Cd	T	-	-	-	-	-	a	ab	a	b	c	a	b	ac	bc	d
	B1	a	a	a	b	b	ac	ac	a	b	c	a	b	ab	b	c
	B2	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b

Annexe 4 : Distances d'isolement des points d'eau lors des épandages des boues de STEP (Arrêté du 8 janvier 1998)

Nature des activités à protéger	Distance d'isolement minimale	Domaine d'application
puits, forages, sources, aqueducs transitant des eaux destinées à la consommation humaine en écoulement libre, installations souterraines ou semi-enterrées utilisées pour le stockage des eaux, que ces dernières soient utilisées pour l'alimentation en eau potable ou pour l'arrosage des cultures maraîchères	35 mètres	tous types de boues pente du terrain inférieure à 7%
	100 mètres	tous types de boues pente du terrain supérieure à 7%
cours d'eau et plans d'eau	35 mètres des berges	cas général, à l'exception des cas ci-dessous :
	200 mètres des berges	boues non stabilisées ou non solides et pente du terrain supérieure à 7%
	100 mètres des berges	boues solides et stabilisées et pente du terrain supérieure à 7%
	5 mètres des berges	boues stabilisées et enfouies dans le sol immédiatement après l'épandage et pente du terrain inférieure à 7%.

Annexe 5 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution des teneurs en EM et ETM des organes en fonction de la durée de culture : (A0 : aiguilles anciennes A1 : aiguilles néoformées, RAM : ramifications, TP : tige principale, RP : racine pivot et RL : racines latérales. T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha⁻¹ de boues de STEP).

Organes	A0				A1				RAM				TP				RP				RL				
Récoltes (mois)	3	6	12	18	3	6	12	18	3	6	12	18	3	6	12	18	3	6	12	18	3	6	12	18	
Cu	T	a	ab	b	-	ab	ab	a	b	a	a	a	b	a	ab	bc	c	a	a	a	b	a	ab	ab	b
	B1	ab	a	b	-	ab	ab	a	b	a	a	b	c	a	a	b	c	a	a	a	b	a	a	a	b
	B2	ab	a	b	-	a	a	b	c	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b
Zn	T	a	ab	b	-	a	ab	b	c	a	a	a	b	a	a	b	b	a	ab	b	c	a	a	ab	b
	B1	a	a	b	-	a	a	a	b	a	a	b	c	a	a	a	b	a	a	b	c	a	a	b	b
	B2	a	a	b	-	a	a	a	b	a	a	b	c	a	a	a	b	a	a	b	b	a	ab	b	c
Pb	T	a	a	a	-	a	a	b	-	a	a	b	b	a	a	b	-	a	a	a	b	a	a	a	b
	B1	a	a	b	-	a	a	b	-	a	a	b	b	a	a	b	-	a	a	a	b	a	a	a	b
	B2	a	a	b	-	a	a	b	-	a	a	b	c	a	a	b	-	a	a	b	c	a	a	a	b
Cd	T	a	a	b	-	a	a	a	a	a	a	a	b	a	ab	b	c	a	b	b	c	ab	ac	b	c
	B1	a	a	b	-	a	a	b	b	a	a	b	c	a	a	b	c	a	ab	b	c	ab	a	b	c
	B2	a	a	b	-	a	ab	ab	b	a	a	a	b	a	ab	bc	c	a	a	a	b	a	a	a	b
P	T	a	a	a	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b
	B1	a	a	b	-	a	a	a	b	a	a	b	c	a	a	b	b	a	a	a	b	a	ab	bc	c
	B2	a	a	a	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b
K	T	a	a	a	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	bc	ab	c
	B1	a	a	b	-	a	ab	b	c	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	b	b
	B2	a	a	a	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b
Na	T	a	a	a	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	ab	ac	b	c	ab	a	b	ab
	B1	a	a	b	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	b	ab	ab
	B2	a	ab	b	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	a
Ca	T	a	a	b	-	a	a	b	c	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	ab	b	b
	B1	a	a	b	-	a	a	b	b	a	a	a	b	a	ab	b	c	a	a	b	c	a	ac	b	bc
	B2	a	a	b	-	a	ab	b	c	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	b	c	a	a	b	b
Mg	T	a	a	a	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	bc	b	c
	B3	a	a	b	-	a	a	a	b	a	a	b	c	a	a	a	b	a	a	a	b	a	b	c	c
	B4	a	a	b	-	a	a	a	b	a	a	a	b	a	ab	b	c	a	ab	b	c	a	a	b	c

Annexe 6 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution de la biomasse sèche de la partie aérienne et racinaire, le % d'azote dans les aiguilles et les racines latérales en fonction de la durée de culture (T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha⁻¹ de boues de STEP).

Durée de culture (mois)		1,5	3	6	12	18
Biomasse sèche de la partie aérienne	T	a	a	a	a	b
	B1	a	a	a	a	b
	B2	a	a	ab	b	c
Biomasse sèche de la partie racinaire	T	a	a	a	a	a
	B1	a	a	ac	b	bc
	B2	a	a	a	b	b
% N dans les aiguilles	T	ab	a	bd	c	d
	B1	a	ab	ac	bcd	ad
	B2	a	bc	cde	e	ab
% N dans les racines latérales	T	ab	ac	ad	b	cd
	B1	a	ab	ab	b	a
	B2	a	a	ab	b	a

Annexe 7 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution de la hauteur de la tige en fonction de la durée de culture (T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha⁻¹ de boues de STEP).

Durée de culture (mois)		0	1	2	3	4	7	9	18
Croissance en hauteur	T	a	a	a	ab	bc	cd	cd	d
	B1	a	a	a	ab	bc	c	d	d
	B2	a	a	a	a	b	c	d	e

Annexe 8 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution du taux de croissance relative (RGR) en fonction de la durée de culture (T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha⁻¹ de boues de STEP).

Durée de culture (mois)		0 - 3 mois	1,5 - 6 mois	3 - 12 mois	6 - 18 mois
Taux de croissance relative (RGR)	T	a	b	bc	c
	B3	a	b	bc	c
	B4	a	b	c	c

Annexe 9 : Résultats de l'analyse statistique de l'évolution des teneurs en EM et ETM dans les différents cernes (T : les plants témoins, B1 : les plants amendés avec 30 t MS ha⁻¹ et B2: les plants amendés avec 60 t MS ha⁻¹ de boues de STEP).

Cernes		2008	2009	2010	Ecorce
P	T	a	ab	b	c
	B1	a	ab	b	c
	B2	a	a	b	c
K	T	a	ab	a	b
	B1	a	a	ab	b
	B2	a	a	ab	b
Na	T	-	a	a	a
	B1	-	a	a	a
	B2	-	a	a	a
Mg	T	a	a	b	c
	B1	a	a	a	b
	B2	a	a	a	b
Ca	T	a	a	a	b
	B1	ab	a	a	b
	B2	a	a	a	b
Mn	T	a	ab	b	c
	B1	a	a	a	b
	B2	a	a	a	b
Cu	T	-	a	b	b
	B1	-	a	a	a
	B2	-	a	ab	b
Zn	T	a	b	ab	ab
	B1	a	b	b	ab
	B2	a	a	a	a
Cd	T	a	a	a	b
	B1	a	a	a	b
	B2	a	a	a	b
Pb	T	a	a	a	a
	B1	a	b	b	b
	B2	a	a	a	a

Annexe 10 : Evaluation of municipal sewage sludge impacts on forest ecosystems: benefits and risks. Integrated Water Resources Management and Challenges of the Sustainable Development, 24-26 March 2010. Agadir (Maroc)



UFC
UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Evaluation of municipal sewage sludge impacts on forest ecosystems: benefits and risks



CHRONO ENVIRONNEMENT

Bourioug M.*, Alaoui-Sossé L., Raouf N., Laffray X., Benbrahim M., Badot P.M. & Alaoui-Sossé B.
 UMR UFC/CNRS 6249 Chrono-Environment Laboratory, Franche-Comté University, 2, place Leclerc F-25030 Besançon cedex, France
 (*) Corresponding author: mohamed.bourioug@univ-fcomte.fr

The use of sewage sludge as fertilizer is an appealing solution for sustainable management of this waste product (Bramryd, 2002). This sludge has been extensively used as manure in order to improve the quality of agricultural soils. However, an excessive spreading could also lead to a soil contamination with heavy metals (HMs) and/or some organic pollutants usually contained in sludge and that may be transferred along the food chain. As a consequence, the public opinion and more and more farmers are now opposed to that practice. An alternative solution for sewage sludge valorisation could consist in spreading them on forest parcels rather on fields, which couldn't present any risk for human and cattle health.

Objective

The aim of this study, led on young larch seedlings, was to evaluate the balance between benefit effects on growth linked to a nitrogen supplementation and an eventual toxicity attributable to the high copper and zinc concentrations in the used sludge.

Soil and sludge characteristics

	mg.g ⁻¹ DW			µg.g ⁻¹ DW			
	pH	Total N	P2O5	Cd	Cu	Pb	Zn
Soil	4.46	1.43	0.005	0.07	11	26	61
Liquid sludge	5.72	65.84	15.51	0.13	843.8	15.9	592.8

Materials and methods

After 6 weeks

24/14° C Day/Night, 60% RH, 14h photoperiod, PAR = 200 µmol m⁻²s⁻¹

- Growth parameters,
- Enzyme activities: Nitrate reductase (NR) and Superoxide dismutase (SOD) assayed according to Billard et Langlois (1986) and Deschamps & Fridovich (1971) respectively,
- Nitrogen (Kjeldahl method) and Heavy metal (HMs) (AAS).

* Significant differences (p<0.05) between treatments were highlighted by using one-way ANOVA and Kruskal-Wallis's post hoc test (R statistical analysis software)

Results

Biomass accumulation

Stem and root elongations

Soluble and insoluble N contents in larch seedlings:

Concerning biomass accumulation, no significant difference was observed between control and S1 treatment. However, treatment S2 induced a significant decrease in dry matter accumulation both in aerial and root parts. Sludge application had no significant effect on stem and root elongations.

	C			S1			S2		
	Sl	Ts	Bs	Sl	Ts	Bs	Sl	Ts	Bs
Total N mg.g ⁻¹ DM	-	1.5 ± 0.06	1.5 ± 0.1	21.3 ± 5.3	2.3 ± 0.3	1.4 ± 0.03	30.9 ± 5.5	2.3 ± 0.3	3.3 ± 0.3
	Sl	-	-	224.04 ± 57.34	14.31 ± 4.11	0.26 ± 0.04	332.93 ± 53.97	43.17 ± 5.9**	9.15 ± 0.72
	Ts	10.34 ± 1.65	8.88 ± 1.58	9.69 ± 3.02	4.91 ± 1.35	0.26 ± 0.04	9.72 ± 3.62	0.52 ± 0.15	0.13 ± 0.04
Total Cu µg.g ⁻¹ DM	Sl	-	-	4.91 ± 1.35	0.26 ± 0.04	0.18 ± 0.11	9.72 ± 3.62	0.52 ± 0.15	0.13 ± 0.04
	Ts	0.14 ± 0.19	0.12 ± 0.03	0.18 ± 0.11	134.2 ± 29.9	188.6 ± 26.1	188.6 ± 26.1	38.6 ± 6.1*	31.3 ± 6.7
	Bs	0.12 ± 0.03	0.18 ± 0.11	0.13 ± 0.04	134.2 ± 29.9	188.6 ± 26.1	188.6 ± 26.1	38.6 ± 6.1*	31.3 ± 6.7
Exchangeable Cu µg.g ⁻¹ DM	Sl	-	-	4.91 ± 1.35	0.26 ± 0.04	0.18 ± 0.11	9.72 ± 3.62	0.52 ± 0.15	0.13 ± 0.04
	Ts	0.14 ± 0.19	0.12 ± 0.03	0.18 ± 0.11	134.2 ± 29.9	188.6 ± 26.1	188.6 ± 26.1	38.6 ± 6.1*	31.3 ± 6.7
	Bs	0.12 ± 0.03	0.18 ± 0.11	0.13 ± 0.04	134.2 ± 29.9	188.6 ± 26.1	188.6 ± 26.1	38.6 ± 6.1*	31.3 ± 6.7
Total Zn µg.g ⁻¹ DM	Sl	-	-	4.91 ± 1.35	0.26 ± 0.04	0.18 ± 0.11	9.72 ± 3.62	0.52 ± 0.15	0.13 ± 0.04
	Ts	30.7 ± 1.7	29.1 ± 1.4	29.9 ± 4.5	134.2 ± 29.9	188.6 ± 26.1	188.6 ± 26.1	38.6 ± 6.1*	31.3 ± 6.7
	Bs	29.1 ± 1.4	29.9 ± 4.5	31.3 ± 6.7	134.2 ± 29.9	188.6 ± 26.1	188.6 ± 26.1	38.6 ± 6.1*	31.3 ± 6.7

[Zn] in sludge layers at the top of the pots were high but no significant transfer to the underlying soil could be observed, excepted for S2. In the same manner, sludge layer showed a high total [Cu] but available fraction represent only a weak part. The total Cu-content was however only increased in the S2 top layer of soil.

Conclusion

Sludge waste application improve biomass accumulation and shoot and root elongations only after 6 months of culture (data not shown). Panda *et al.* 2005 have shown that high copper content might inhibited the NR activity. However, in spite of no significant copper accumulation could be recorded in larch seedlings (data not shown), NR activity significantly decreased in needles. As nitrate wasn't the only nitrogen supply in sludge, larch seedlings might have ensure their nitrogen supply by absorbing other mineral forms, especially NH₄⁺. SOD the first enzyme implied in the oxidative stress pathway, showed a significantly increased activity when larch seedlings were exposed to sludge. Because of the weak levels of HM detected in plants, the observed oxidative stress might be generate rather by an organic compound usually contained in waste water sludge.

Integrated Water Resources Management and Challenges of the Sustainable Development Agadir 24-26 March 2010
Acknowledgments. The authors are indebted to ADEME, Conseil régional And l'agence de l'eau for financial support.





198

Annexe 11 : Effects of paper mill sludge on soil properties and on growth and nitrogen content of sunflower (*Helianthus annuus*). Integrated Water Resources Management and Challenges of the Sustainable Development, 24-26 March 2010. Agadir (Maroc)



UFC
UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Effects of paper mill sludge application on soil properties and sunflower seedlings growth (*Helianthus annuus*, L.)

Laffray, X., Bouriou, M., Alaoui-Sehmer, L., Lemal, L., Badot, P.M. & Alaoui-Sossé, B.*
UMR UFC/CNRS 6249 Chrono-Environment Laboratory, Franche-Comté University, 2, place Leclerc F-25030 Besançon cedex, France
(*) Corresponding author: badr.alaoui-sosse@univ-fcomte.fr

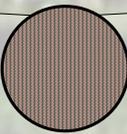


CHRONO ENVIRONNEMENT

Introduction

Wood pulping and paper producing industries generate large amounts of pollutants, ie. at the end of the 20th century the French paper mills produced about 2 millions tons of dry waste sludges every year (AND International, 2002).

These sludges are primarily used as an organic amendment rather than as fertilizers, because of low mineral nutrient contents.



New recycling processes in industrial paper production generate considerable amount of organic wastes which are till now deposited in waste dump areas. These secondary paper mill sludges are from now on proposed for use in agriculture to improve soil properties.

Objective

The aim of the experiment was to evaluate the impact of paper mill sludge amendment on the physico-chemical soil properties. The amending effects on sunflower seedlings through growth and some physiological parameters were also assessed.

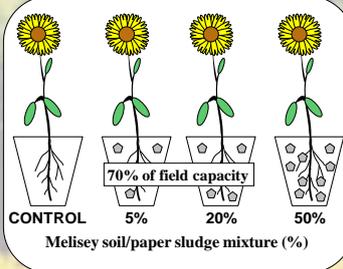
Material

Controlled conditions : 24/18°C D/N T°C (±1°C), 70% RH, 16h photoperiod with 174 μmol m⁻² s⁻¹ illumination level.

The soil used in this study came from Melisey (Franche-Comté, France). It was classified as an acid pseudo-luvisol sandy clay loam with dysmull, (FAO classification key) and soil nutrient supplies are moderate.

Table 1 : Melisey soil and paper mill sludge characteristics

(μg g ⁻¹)	Cu	Pb	Zn	Ca	pH (2,5)	C/N
Soil	11.00	26.00	61.00	0.06	4.76	18.50
Sludge	193.00	25.00	164.00	39.20	7.72	111.70
(mg g ⁻¹)	Mg	Na	Fe	N	P	K
Soil	0.02	0.15	10.97	3.92	0.005	0.11
Sludge	228.00	0.62	18.10	0.12	13.50	2.00



CONTROL
5%
20%
50%
Melisey soil/paper sludge mixture (%)

Sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) were germinated and grown for 7 weeks into 2-L plastic pots containing 2kg of Melisey soil mixed with 0, 5, 20 and 50% paper sludge. Plants were watered twice a week with distilled water to maintain minimal supply of extra nitrogen and mineral element.

Table 2 : pH classification (French pedological reference base)

pH spectrum	<3.5	3.5 – 5	5 – 6.5	6.5 – 7.5	7.5 – 8.7	> 8.7
Soil type	hyper acid	very acid	acid	neutral	basic	very basic

Method

Gas exchanges photosynthetic activity (A), stomatal conductance to water vapour (Gw), transpiration rate (E), leaf internal CO₂ concentration (Ci), and water use efficiency (WUE) were measured with an infrared gas analyzer (LI-6400 Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Leaf water potential (ψ_w) was measured with a scholander pressure chamber (Model 3005, Soil moisture equipment corporation) according to the method described by Scholander et al. (1965). Biomass production was expressed as dry weight (DW). Total N content from dried pooled samples was determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1980).

Results : Soil properties

Table 3 show that paper sludge application induced :

- an increase of soil water capacity (from 18 to 37% ; *** p<0.001) ;
- an increase of the soil pH (Ref. French pedological reference base).
- A decrease of the soil density (-15 and -38% for 20 and 50% amendment respectively ; *** p<0.001).

Table 3 : Paper mill sludge effects on soil physical parameters

Parameters (W7)	Control	5%	20%	50%
Water Retention *	49.91 ^a	59.05 ^b	65.00 ^{bc}	68.52 ^c
pH	4.56 ^a	4.83 ^a	5.08 ^{ab}	6.97 ^c
Soil density	1.07 ^a	1.03 ^a	0.91 ^b	0.66 ^c

Results : Plant development

Application of 5 and 20% paper sludge induced an increase of the :

- shoot DW (23 and 54% respectively ; *** p<0.001) ;
- root DW (64 and 130% respectively ; *** p<0.001).
- total leaf area (64 and 61% respectively ; not significant)

20 and 50% paper sludge application induced a decrease of the root/shoot ratio (-35 and -44% respectively ; ** p<0.01) while a 5% application didn't induce any significant effect.

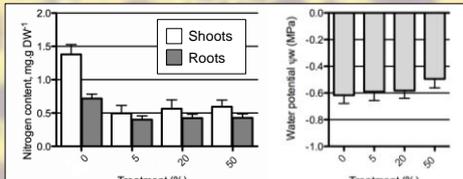
Table 4 : Paper mill sludge effects on plant development

Parameters (W7)	Control	5%	20%	50%
Total leaf area, cm ²	53.88 (±22.54) ^a	88.16 (±26.09) ^a	86.97 (±12.29) ^a	65.97 (±12.29) ^a
Aerial Biomass, g DW.plant ⁻¹	0.35 (±0.04) ^a	0.43 (±0.05) ^a	0.54 (±0.05) ^b	0.28 (±0.05) ^a
Root Biomass, g DW.plant ⁻¹	0.069 (±0.015) ^a	0.113 (±0.014) ^b	0.159 (±0.012) ^c	0.096 (±0.013) ^b

Table 5 : Gas exchange parameters of the last fully expanded leaves of *Helianthus annuus* plants grown on paper mill sludge compared to the controls

	Amax (μmol CO ₂ /m ² s)	Gw (mmol H ₂ O/m ² s)	E (mmol H ₂ O/m ² s)	Ci (ppm)	WUE (μmol CO ₂ /mmol H ₂ O)
Control	7.22 ^a	137 ^a	2.09 ^a	143 ^a	3.46 ^a
5%	5.40 ^b	154 ^b	2.33 ^b	227 ^b	2.32 ^b
20%	4.41 ^c	188 ^c	2.75 ^c	277 ^c	1.61 ^c
50%	3.78 ^d	221 ^d	3.11 ^d	306 ^d	1.22 ^d
P	***	***	***	***	***

Figure 1 : Total N-content and leaf water potential of *Helianthus annuus* plants grown on paper mill sludge, in comparison to the controls



Sludge application induced a decrease of the :

- shoot N-content (-57 to -64% ; *** p<0.001)
- root N-content (-40 to -44% ; *** p<0.001).

Conclusion

Application of paper mill pulp has a positive effect on the physical properties of the Melisey soil. Soil density was decreased allowing a better soil water retention and an increase of seedling root and shoot development as well. However, when soil was amended with sludges, the level of soil nitrogen decreased, and consecutively the plant N-content was also reduced compared to control. As a consequence, the photosynthetic capacity recorded was lowered. The low plant N-concentration after treatment might be explained by an increased soil N-immobilisation by a stimulated microbial activity depending on the quite elevated nitrogen and carbon contain of sludges.

AND International, 2002. Evaluation des quantités actuelles et futures de déchets épandus sur les sols agricoles et provenant des activités industrielles hors agroalimentaire. Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de l'Aménagement du territoire, Paris, 77p. - Scholander et al., 1965. Sap pressure in vascular plants. Science, 148:339-46. - AOAC, 1980. In: Harwell W, editor. Official methods of Analysis. Washington: Association of Official Analytical Chemists, p. 127-3.

Annexe 12 : Growth and trace elements accumulation responses of snails (*Helix aspersa*) exposed to sewage sludge in forest ecosystem. Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 22 juin 2011. Paris, France.

Growth and trace elements accumulation responses of snails (*Helix aspersa*) exposed to sewage sludge in forest ecosystem

Bouriou M.^{1*}, Gimbert F.¹, Laffray X.¹, Alaoui-Sossé L.¹, Benbrahim M.², Badot P.M.¹, Alaoui-Sossé B.¹

¹UMR UFC/CNRS 6249 Chrono-Environment Laboratory, Franche-Comté University, 2, place Leclerc F-25030 Besançon cedex, France

²RITMO Agroenvironnement, ZA Biopôle, 37 rue de Herrlisheim, CS 80023, F-68 025 COLMAR CEDEX.

(*) Corresponding author: mohamed.bouriou@univ-fcomte.fr

Introduction

Spreading sewage sludge on forest ecosystems may become an alternative way of their valorization. However, the possible deleterious effects of such spreading such remain to be elucidated. Intensive use may cause soil contamination extending to the whole trophic chain. Snails play an essential role in soil and food chain functioning, being intimately associated with soil, plant and secondary consumers. They can accumulate Trace Metals (TMs) in a contaminated environments (de Vaufléury et al., 2006) and constitute a source of contamination for both terrestrial invertebrates and vertebrates (Scheifler et al., 2006; Hispard et al., 2008), among which humans.

Objective

The aim of this investigation was to assess the effect of sewage sludge (SS) amendment on growth, mortality of snails and bioaccumulation of TMs (Cu, Zn, Pb and Cd) in their bodies.

Materials and methods

10 sub-adult snails (5 g) were exposed during 28 days in triplicate microcosms deployed in control (C) and sewage sludge amended (S) 6 m² plots. S places had previously received 0.4 t DW per hectare in 2008 or 3 t DW per hectare of sludge in 2009 or 2010 respectively. After 14 and 28 days of exposure, two snails were randomly sampled in each microcosm. Vegetation, litter, soil were also sampled and analyzed for TMs.



Results and discussion

Survival and growth

Mortality was extremely low during this experiment. Less than 1% of death has occurred in the course of the experiment in C2 at the last sampling date. At the end of the exposure, at 28 days, snail DWs were significantly decreased ($p < 0.001$) compared to their initial weights, whatever the treatment. The repulsive nature of vegetation was probably responsible for the observed negative effect on growth. No significant difference could be found between treatments. These results support those previously obtained by Scheifler *et al.* (2003) *i.e.* no effects of sludge exposure on mortality or growth. Because the concentration of trace elements per unit dry weight may increase with decreasing bodyweight, we chose to express our results as total body burden.

TM contents

Figure 1 – TMs within snail body

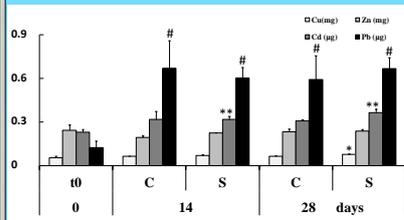


Figure 2 – TMs in plants

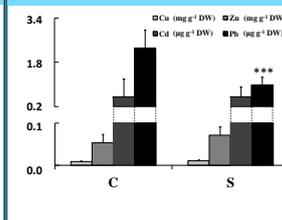


Table 1 – TMs in litter and top soil

	Cu (mg g ⁻¹)	Zn (mg g ⁻¹)	Pb (µg g ⁻¹)	Cd (µg g ⁻¹)
Litter S	70.9 ± 22.6**	68.2 ± 29.7***	28.1 ± 9.2*	0.16 ± 0.05**
Litter C	40.4 ± 11.2	15.6 ± 8.2	17.2 ± 4.6	0.09 ± 0.02
Topsoil S	36.8 ± 5.9	19.3 ± 9.6*	27.3 ± 8.8	0.08 ± 0.02
Topsoil C	31.3 ± 4.6	10.4 ± 1.2	22.9 ± 1.4	0.06 ± 0.02

No significant differences were found between replicates (S₁₋₃ and C₁₋₃). Thus, the values were cumulated (n=18 for S and n=12 for C).

* Significant difference between treatments.

Significant increase after exposure with t0.

Zn and Cu are both essential trace elements (Hopkin, 1989). No Zn accumulation was detected during the exposure period, but on the contrary, the Cu level showed a significant increase after only 28 days (Figure 1). Concerning non-essential metal, the content of Pb was significantly (5.5 times) increased in all snails compared to Pb snail content at the beginning of the experiment (t₀). Frequently, uptake of non-essential metals results of chemical similarities with some other essential elements, that allow them to follow their uptake routes (Beeby, 1991). However, this result occurred in both control and sludge treated plots, and therefore can not be attributed to S amendment. The most significant part of Pb accumulate in snails could come from the soil itself, which present a natural high Pb concentration. A comparison between Cd contents measured at the first and at the second exposure times, showed that they significantly increased in snails exposed to sewage sludge.

The obtained results (Figure 2) show similar Cu, Zn and Cd concentrations in plants harvested in control and in treated plots. For Pb however, the concentration was lower in plants of the treated areas than in plants of the control areas. This last result is negatively correlated with results found on snail which show a greater Pb content in snails from treated areas. Given that vegetation was scarcely eaten by snails, the role of plant in TMs transfer is quite low. Cu, Zn, Pb and Cd concentrations increases at litter level of amended plots (S) compared with control (C) (Table 1). However that accumulation induces an increase in snail metal contents only in case of Cu and Cd. Zn was not accumulate at all whereas no clear conclusion can be drawn concerning Pb transfer.

Conclusion

Despite the absence of toxic effects on snails in the present study no definite conclusion can be drawn on the long term effect of sludge amendment. In fact, because of the important level of TMs present at the litter level, the long term process of mineralisation has to be taken into account. And it is known that bioaccumulation is strongly linked to bioavailability. Furthermore, the effect on other bioindicators like earthworms should be studied in order to assess the sludge harmlessness.

Beeby, A., 1991. Toxic metal uptake and essential metal regulation in terrestrial invertebrates: a review. In: Newman, M.C., Melnick, A.W. (Eds.), Metal ecotoxicology: concepts and applications. Lewis Publishers, Michigan, pp. 65-89.
 De Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Pandard, P., Scheller, R., Lory, C., Irl, N., Badot, P.M., 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. Environmental Toxicology and Chemistry 25:797-806.
 Hispard, F., de Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Durieux, S., Scheller, R., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Martin, H., Ribbert, L., Berthelot, A., Badot, P.M., 2008. Comparison of transfer and effects of Cd on rats exposed in a short experimental aquatic food chain or a Cd₂-dosed food. Environ. Int. 34:381-389.
 Hopkin, S.P., 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science, New York.
 Scheifler, R., Ben Brahim, M., Goussot de Vaufléury, A., Carrez, L.M., and Badot P.M., 2003. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. Environmental Pollution 122: 343-350.
 Scheller R., de Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Irl, N., Badot, P.M., 2006. transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: a microcosm study. Environmental Toxicology and Chemistry 25:815-822.



Annexe 13 : Les réponses écotoxicologiques des escargots *Cantareus aspersus* exposés à des sols amendés par les boues urbaines. 4ème Séminaire d'Écotoxicologie de l'INRA, Saint Lager, 7-9 Novembre 2011.

Les réponses écotoxicologiques des escargots *Cantareus aspersus* exposés à des sols amendés par les boues urbaines

Bourioug M.^{1*}, Gimbert F.¹, Alaoui-Sossé L.¹, Benbrahim M.², Badot P.M.¹, Alaoui-Sossé B.¹

¹UMR UFC/CNRS 6249 Chrono-Environnement Laboratory, Franche-Comté University, 2, place Leclerc F-25030 Besançon cedex, France

²RITMO Agroenvironnement, ZA Biopôle, 37 rue de Herrlisheim, CS 80023, F-68 025 COLMAR CEDEX.

(*) Corresponding author: mohamed.bourioug@univ-fcomte.fr

Introduction: L'épandage forestier est une alternative complémentaire au recyclage agricole des boues urbaines permettant un apport d'azote et de phosphore très bénéfique pour les sols forestiers pauvres (Grenier et Couillard, 1989). Cependant, les contaminants présents dans certaines boues, et en particulier les éléments traces métalliques (ETM), présentent un risque d'accumulation dans les sols et de transfert à l'ensemble de l'écosystème via la chaîne trophique. Les escargots *Cantareus aspersus* élevés dans des conditions standardisées peuvent être utilisés comme organismes tests pour étudier la toxicité des métaux (de Vaulfleur *et al.*, 2006; Scheifler *et al.*, 2003).

Objectifs: L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact d'un apport de boues sur le continuum sol-plante (*Lactuca sativa*)-escargot (*Cantareus aspersus*) et le transfert éventuel des ETM (Zn, Cu, Cd et Pb).

Matériels & méthodes L'exposition est réalisée dans des boîtes transparentes (1,6 L) remplies de 1 kg MS d'un sol forestier acide dont l'humidité est fixée à 70% de la capacité au champ. Douze escargots juvéniles (1,0 ± 0,3g) ont été exposés pendant 28 jours à un sol témoin (ST) ou contaminé (SC) (3, 30 et 60 t MS ha⁻¹) par les boues de STEP et nourris avec de la laitue témoin (LT) ou contaminée (LC) ayant poussée sur des sols amendés (3, 30 et 60 t MS ha⁻¹). Après 7, 14 et 28 jours d'exposition, 4 escargots ont été prélevés dans chaque réplicat de chaque modalité, pesés, mesurés, lyophilisés et analysés par ICP. Une ANOVA suivie d'un test de Tukey ont été appliquées aux résultats.

Résultats & discussion

Tableau 1 – Teneurs en ETM de la surface du sol (µg g⁻¹ MS):

	Cu	Zn	Pb	Cd
ST	14,19 ± 2,52 ^a	39,26 ± 2,46 ^a	15,60 ± 0,62 ^a	0,06 ± 0,01 ^a
SC 3 t	22,07 ± 1,93 ^b	40,33 ± 1,10 ^a	16,85 ± 1,90 ^{ab}	0,07 ± 0,01 ^a
SC 30 t	84,07 ± 9,89 ^b	73,02 ± 6,58 ^b	18,73 ± 1,37 ^{bc}	0,13 ± 0,01 ^b
SC 60 t	114,19 ± 19,96 ^c	89,68 ± 11,31 ^c	20,94 ± 3,11 ^c	0,19 ± 0,04 ^c

Tableau 2 – Teneurs en ETM des feuilles de laitue (µg g⁻¹ MS):

	Cu	Zn	Pb	Cd
LT	10,33 ± 2,07 ^a	54,64 ± 11,97 ^a	1,02 ± 0,32 ^a	0,33 ± 0,24 ^a
LC 3t	10,17 ± 2,27 ^a	89,95 ± 23,94 ^{ab}	1,17 ± 0,23 ^a	1,10 ± 0,34 ^b
LC 30t	10,47 ± 1,21 ^a	107,96 ± 18,21 ^b	1,44 ± 0,25 ^a	0,66 ± 0,22 ^{ab}
LC 60t	11,12 ± 0,64 ^a	138,8 ± 26,31 ^b	1,14 ± 0,37 ^a	0,50 ± 0,12 ^{ab}

Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Les concentrations des ETM en surface du sol ont augmenté avec les apports des boues à partir de 30 t MS ha⁻¹ (Tableau 1). La laitue, ayant poussée sur des sols amendés, présente une meilleure croissance même si elle accumule davantage de Zn et de Cd (Denaix *et al.*, 2003) (Tableau 2).

La mortalité des escargots n'a pas dépassé 3%. On note généralement une augmentation significative de la masse fraîche du corps mou et de la masse sèche de la coquille avec l'apport de boues (Figure 1). Néanmoins, cette stimulation de la croissance est moins marquée avec l'apport de 60t.

Figure 2 – Cinétiques de la bioaccumulation des ETM dans les escargots et estimations du flux d'assimilation (a : µg/escargot/jour) (Gimbert *et al.*, 2008)

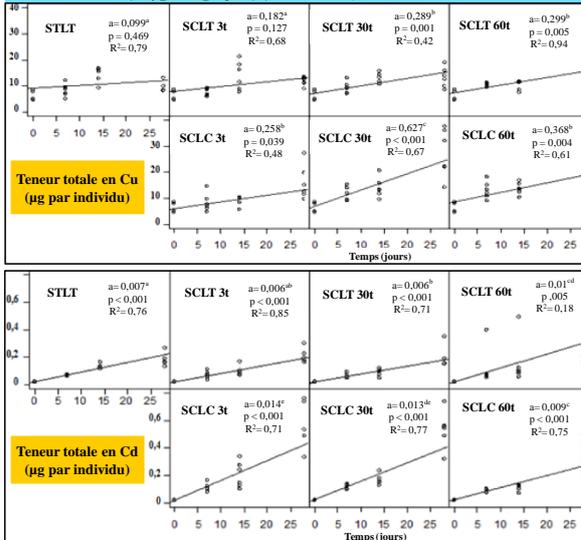
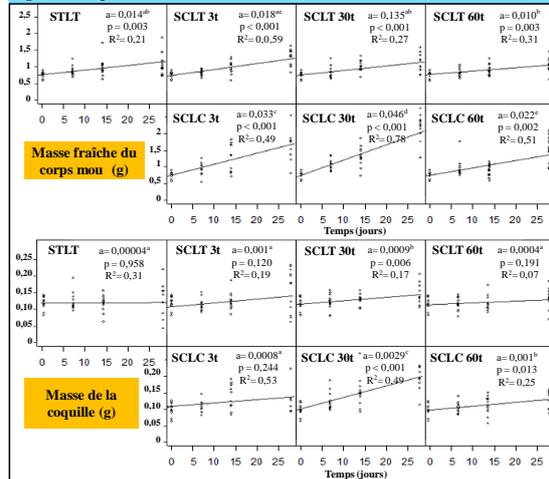
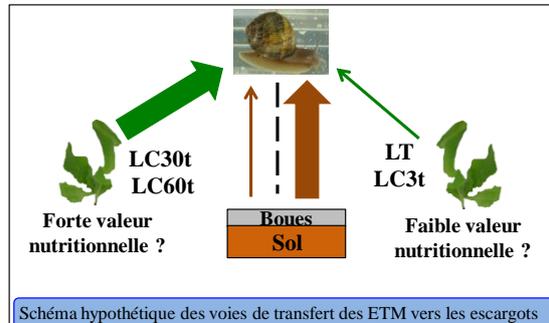


Figure 1 – Les paramètres de croissance:



→ les flux d'assimilation du Cu et du Pb dépendraient essentiellement de la contamination du sol par les boues,
 → aucun transfert du Zn via le sol n'a été mis en évidence; la laitue apparaît comme la source principale de contamination des escargots.
 → le transfert du Cd vers les escargots est significatif même pour la modalité STLT. Cependant, ce transfert se fait préférentiellement par voie indirecte *i.e.* la laitue contaminée,



Conclusion Dans les conditions de la présente étude, l'épandage de boues de STEP ne montre aucun effet négatif sur les paramètres de croissance étudiés. Cependant, une bioaccumulation significative des ETM chez les escargots a été observée. Les voies de transfert dépendraient de la qualité nutritionnelle de la laitue. Ces expérimentations devraient être répétées sur d'autres organismes de la faune du sol afin de s'assurer de l'innocuité de cet épandage.

.Denaix L., Carrhito de Almeida L., Masson F., Mench M. & Sappin-Didier V., 2003. Devenir et effets des contaminants dans les agroécosystèmes et écosystèmes terrestres, 20-21 mars 2003, Lille.
 .De Vaulfleur, A., Coeurassier, M., Pandard, F., Scheifler, R., Levy, C., Friti, N. & Badot, P.M., 2006. Environmental Toxicology and Chemistry 25:797-806.
 .Gimbert F., de Vaulfleur A., Donay F., Coeurassier M., Scheifler R., Badot P.-M., 2008. Ecotoxicology and Environmental Safety 70: 138-146.
 .Grenier Y., & Couillard D., 1989. Forestry Chronicle, 65 (1): 9-16.
 .Scheifler R., Ben Brahim M., Gomot-de Vaulfleur A., Carnus J.-M. and Badot P.-M., 2003. Environmental Pollution 122 : 343-350.



Annexe 14 : Evaluation of sewage sludge effects on soil properties, plant growth, mineral nutrition state and heavy metal distribution in European larch seedlings (*Larix decidua*)

Bourioug M.¹, Alaoui-Sehmer L.¹, Laffray X.², Raouf N.¹, Benbrahim M.³, Badot P.-M.¹, Alaoui-Sossé B.¹

¹: *Laboratoire de Chrono-environnement, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, Université de Franche-Comté, Place Leclerc, F-25030 Besançon cedex, France.*

²: *Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN) – Département Systématique et Evolution, Case 39, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France.*

³: *RITTMO Agroenvironnement, ZA Biopôle, 37 rue de Herrlisheim, CS 80023, F-68025 Colmar cedex, France.*

Tel.: +33 381 665 730

Fax: +33 381 665 797

E-mail: badr.alaoui-sosse@univ-fcomte.fr

Abstract

This study assessed the effects of sewage sludge applications on nutrient uptake and growth parameters of larch seedlings (*Larix decidua*). It also included studies of heavy metal behaviours (Cu, Zn, Pb and Cd) on acid forest soil and their accumulation in plants. The response to heavy metal toxicity has been investigated by analyzing the superoxide dismutase activity. Sludge was applied at three loading rates (0, 30 and 60 Mg DW ha⁻¹) and harvesting was done after 6 weeks. The results demonstrated that nitrogen and phosphorus contents increased significantly in top soil of pots receiving sludge while no modification appeared in bottom soils. Similar results were obtained only at higher dose (60 Mg DW ha⁻¹) for Cu and Zn concentrations. However, no such difference was observed for total soil micronutrients. Despite a significant increase in plant nitrogen concentration, the use of sewage sludge did not affect larch seedling growth. NR activity decreased significantly with increasing sludge application rates, which suggests that N sources for seedlings are ammonium and/or amino acids. For the other nutrients (P, K, Ca, Mg and Fe) and for all heavy metals, sludge application did not lead to an increase in plant concentrations. In contrast, some elements (P and Cu) have been well excreted by the roots during culture period. The observed increase in SOD levels did not be attributed to HM toxicity and it could be explained by other toxic chemical pollutants present in the sludge.

Keywords: Sewage sludge, *Larix decidua*, heavy metal, forest soil, nitrogen, phosphorus

Introduction

Sewage waste treatment plant produces a liquid effluent of suitable quality that can be returned to natural surface waters with a minimal impact on the environment or on public health. This domestic effluent treatment also produces sewage sludge (SS) which was up to now currently used as source of macro- and micronutrients for agricultural lands. Land application of SS may have many beneficial effects because it improves soil physical properties and increases soil organic matter content what represent several advantages for crops production. However, an excessive spreading also leads to a soil contamination with heavy metals (HMs) and/or with some organic pollutants usually contained in sludge. From there, these contaminants may be transferred along the trophic chain. In many countries, the growing population and urbanization have inevitably increased the volume of the wastewater sludge production. During the past decades, in France, a large proportion of sludge (more than 60 %) was currently valued in agriculture. But nowadays, because some disposal practices have been restricted and because of the citizen awareness increase about environmental and societal problems associated with municipal wastewater and sludge disposal, municipalities need to find new sludge valorization ways that take into account environmental contamination risks. Hence, sludge or biosolids, which represent a major waste by-product, must be managed in responsible ways and not been released into aquatic systems or been allowed to contaminate ground waters. The proposed alternative to the controversial SS agricultural use must insure a safe, economical, and environmentally sound approach to applying SS to the soil. An alternative solution for SS valorization examined in this work could consist in spreading it on forest parcels (**Bastian, 2000**). France's forests are largely located on poor soils and 1 % of this area should be theoretically enough to apply 50 % of sludge at a rate of 3 Mg ha⁻¹ year⁻¹ of dry weight (DW) (**Thomas et al. 2004**). From a safety point of view, forests are suitable for receiving SS because they are not directly linked to the human food chain. From another hand, because of its high nutrient and organic matter content, sludge can provide long-term benefits to forest sites because it is largely organic and releases nutrients relatively slowly. **Kaposts et al. (2000)** showed that after sludge application, ash content in pine needles and mushrooms was reduced, while the concentrations of N, Ca and Mg were increased. Nevertheless, in practice, the use of SS was envisaged to the short rotation coppice (SRC) to achieve high biomass production. In fact, applying SS to forest plantations could potentially enhance tree growth, wood production and improve several soil characteristics (**Henry and Cole 1997; Mosquera-Losada et al. 2001**). Sludge may constitute a good fertilizer as it is a good source of phosphorus (P), nitrogen (N), organic matter and micronutrients (**Ferrier et al. 1996; Bramryd 2001**). In the same way, **Kimberley et al. (2003)** reported that growth responses to municipal biosolids from a pine plantation produced a significant increase in stem volume. Besides supplying N, P and oligo-elements to plants, sludge application can constitute a threat to environment because of its relatively high HMs concentration. For example, **Kimberley et al (2003)** reported that HMs content in forest vegetation slightly increased, remaining however considerably below the admissible levels (between 20 and 50 % of maximum admissible concentrations) for berries and mushrooms. Some other studies have reported negative effects of these toxic elements on plant growth, groundwater quality and long-term soil fertility (**Singh and Agrawal 2008**). These problems

are often associated with trace metals in the sludge, particularly cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb) and zinc (Zn), and therefore, it is important to evaluate the contamination level of the soil-plant system in order to predict the HMs bioavailability, mobility and toxicity. Due to the acid pH of the soil, HMs have been shown to be largely available for plants (Breckle et al. 1992) and susceptible to losses through leaching by natural rainfalls (Fuchs et al. 1997). Faced with this problem, it is necessary to investigate the risks and benefits provided to authorize or not the SS spreading on forest parcels (e.g., Department of the Environment (UK DoE), 1989; United States Environmental Protection Agency (US EPA), 1993; Council of the European Communities, 1999; New Zealand Waste Water Association (NZWWA), 2003). This research should consider all possible risks due to sludge spreading, which means to follow the fate of sludge constituent in the soil, in soil water and in groundwater as well as in plants and wildlife through the tracking of their dispatching along the trophic chain. The goals of this study, led on young larch seedlings (*Larix decidua*), were to evaluate the balance between beneficial effects and the eventual toxicity attributable to high Cu and Zn concentrations in the used sludge. This was addressed by measuring the efficiency of two doses of sludge 30 and 60 Mg DW ha⁻¹ on growth parameters, biomass productivity and N and P nutrition of young larch seedlings. HMs uptake and partitioning within plant tissues and detoxification pathways response were also investigated.

Material and methods

Origin and characterization of soil and sludge

Soil used in this experiment came from a forest area in Mélisey (North-East of France). It was collected from the A to C horizons what correspond to 0 to 60 cm depth. The SS used was purchased by a domestic water treatment plant located in Mélisey. The physico-chemical characteristics of soil and sludge used are shown in **Table 1**.

Table 1 : Mean concentrations of different elements and physicochemical characteristics of the soil and SS used in the experiment.

Parameters (unit)	Soil	SS	Soil limits ^a	SS limits ^a
Cd (µg g ⁻¹ DW)	0.2	1.8	2	10
Cu (µg g ⁻¹ DW)	7.1	843.8	100	1000
Pb (µg g ⁻¹ DW)	13.0	15.9	100	800
Zn (µg g ⁻¹ DW)	61.0	592.8	300	3000
Ca (mg g ⁻¹ DW)	0.5	12.3		
Mg (mg g ⁻¹ DW)	2.7	3.7		
Na (mg g ⁻¹ DW)	0.1	1.4		
Fe (mg g ⁻¹ DW)	10.9	5.2		
Mn (mg g ⁻¹ DW)	0.2	0.2		
pH water (2:5)	4.7	5.7		
N total %	0.1	7.2		
C total %	2.1	41.6		
P total (mg g ⁻¹ DW)	0.2	15.5		
K (mg g ⁻¹ DW)	1.6	5.4		
OM total %	6.4	83.5		
Ratio C:N	20.4	5.8		
DW (g l ⁻¹)	-	22.9		
Clay %	18.6	-		
Loam %	38	-		
Sand %	36.9	-		
CEC	99	-		

^a: French regulatory limits (08/01/98) for concentration of TMs in SS for agricultural use.

Plant material, growth conditions and experimental setup

One year old seedlings of *Larix decidua* (European larch) were purchased from a local nursery. They were immediately transplanted in pots of 3.6 L filled with 3 kg of soil taken from Mélisey's experimental area. Then they were grown in a greenhouse at 14 h photoperiod ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with a temperature regime of 24/14 °C (day/night) and 60 % relative humidity. The pots were shared out into three treatments of five replicates each: untreated control treatment, standard treatment (S1) and high treatment (S2). The sludge was applied on S1 and S2 pots with an equivalence of 30 Mg DW ha⁻¹ and of 60 Mg DW ha⁻¹ for S1 and S2 respectively. For this purpose, the accurate volume of liquid biosolid applied was calculated and because it was large enough, it was applied twice on S1 pots and four times on S2 pots. The application took place two weeks after planting. At that time five plants were harvested, constituting the T0 point.

Sampling and parameter determinations

Six weeks after the beginning of the experiments, *i.e.* 6 weeks after the sludge application, plants were harvested. The main axis was measured and then the aerial part (AP) was removed, allowing an immediate determination of water potential, using the Scholander chamber method. The AP is then cut into separate organs, old needles (N₀), regenerated needles (N₁), main stem (S) and ramifications (RAM). Afterwards, the root part (RP) was carefully removed from the pot, separated from the adhering soil and washed with deionized water. Lateral roots (LR) were removed from taproot (TR) after their lengths have been measured. The fresh weights (FW) of different organs were also determined, and a part of N₁ and LR biomass were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until enzyme activity determinations. The remaining mass and organs were then lyophilized and their dry mass was determined before reducing them into fine powder using a ball mill (Retsch MM 200, Germany). At the same time when plants were harvested, soil samples were taken at three levels of the pot, before that, the all pot structure was disturbed by retiring the root system. The soils were sampled at three levels as follows:

- (i) Sludge level (Sl): correspond to almost 2 cm depth upper layer at the pot. That layer is mainly composed of organic matter previously contained in sludge and in course of mineralization;
 - (ii) Top soil level (Ts): correspond to 5 cm depth layer of soil at the top of the pot, immediately under the sludge layer;
 - (iii) Bottom soil layer (Bs): correspond to 5 cm depth layer of soil at the bottom of the pot.
- The samples were dried in an oven at 60 °C for 48 h, then crushed and sieved to 2 mm.

Chemical and biochemical assays

pH and redox potential of soil

Soil pH was measured in a 2:5 (w/v) ratio of soil to distilled water (**Fuentes 2007**) using a pH-meter (WTW pH 300i Meter). The mixtures were shaken for 2 h before measurement. Soil redox potential was found using Pt electrode inserted at 10 cm below the surface and connected to the pH meter just before harvesting.

Heavy metal and mineral elements determinations

The methods of **McGrath and Cunliffe (1985)** and **Garcia-Delgado et al. (2007)** were applied to determine the total concentrations of HMs in SS, soil and pot soil samples. Approximately 1 g of each sample was weighed out and placed into Pyrex test tube. They were then digested twice with a mixture (1:3, v/v) of 2.5 mL concentrated HNO₃ 65 % and 7.5 mL HCl 36 N. The samples were then mineralized in a block heater during 2 h at 150 °C. The residue obtained was dissolved with distilled water and diluted to 80 mL. Exchangeable fraction of Cu was extracted at room temperature with (1:10 w/v) of CaCl₂ 0.01 M by shaking for 2 h. After each successive extraction, separation was accomplished by centrifuging at 4000 rpm for 10 min. The supernatant was removed, filtered by 0.45 µm pore membrane and then stored until analysis. Acid mixture was used as control. For the vegetal matter, 100 mg of powder of each organ were added to 2 mL of HNO₃ (65 %) and digested on a hot plate during 3 h at 125 °C. Thereafter the volume was brought to 30 mL with distilled water and the sample was then filtered using a 0.45 µm filter tip. The HM (Cu, Zn, Cd, and Pb) and mineral element concentrations (K, Ca, Mg and Fe) were determined by Atomic Absorption Spectrophotometer.

The metal and mineral contents of the plant parts were calculated as a product of dry weight and element concentration for each plant organ. Thereafter, the concentrations in AP, RP and at the whole plant scale were calculated according to the formula: Concentration = metal content / dry biomass.

Carbon and nitrogen analysis

Total C and N were analyzed using a dry combustion CNS analyzer (LECO CNS 2000). The samples, dried and finely ground, were weighed into ceramic sample holders and then directly loaded to the combustion furnace at 1100 °C. The combustion gases liberated were analyzed by infra-red absorption and thermal conductivity detection to assay the carbon and nitrogen content respectively. The carbon to nitrogen ratio (C:N) was calculated as the DW content of total carbon divided by the total nitrogen content.

Enzyme and protein assays

The nitrate reductase (NR) activity was measured following the method of **Billard and Langlois (1986)**. 100 mg of fresh needles (N₁) or LR samples were cut into small sections of 2 mm length in 5 mL phosphate buffer (100 mM, pH 7.5) containing KNO₃ (150 mM) and isopropanol-1 3 % (v/v). The plant material was then infiltrated under vacuum for 10 minutes and incubated at 30 °C for 30 min. The reaction was stopped with 0.5 mL of acetic acid (50 %). Sulphanilamide 29 mM (1 mL) and N-1-naphthylethylenediamine hydrochlorides 7.7 mM (1 mL) solutions were added to 2 mL of incubation solution and the tubes were left in the dark for 15 min. The absorbance was read at 540 nm.

The superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by the method of **Beauchamp and Fridovich (1971)** modified by **Oberley and Spitz (1985)**. This method is based on the ability of the plant extract to inhibit the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium

(NBT). 100 mg of fresh matter (N₁ or LR) were ground in a mortar containing liquid nitrogen with 25 % (w/w) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), 10 % (w/w) polyethylene glycol (PEG) and 1.2 mL phosphate buffer (50 mM, pH 7.8). The obtained crude extract was centrifuged for 20 minutes at 4 °C at 10000g. The resulting supernatant constituted the enzymatic extract. 50 µl of extract were introduced in a cuvet containing the reaction mixture (DETAPAC 1.08 mM, xanthine 190 mM, NBT 70 mM in carbonate buffer 5 mM, pH 7.8). The reaction was started by adding 20 µl xanthine oxidase ($8.33 \cdot 10^{-3}$ U mL⁻¹) and the absorbance change was followed at 560 nm. The SOD activity was expressed as units mg⁻¹ proteins, being one unit, the enzyme amount required to inhibit of 50 % the NBT reduction under light. The soluble protein content in the enzymatic extracts was determined according to the **Bradford method (1976)**. Optical density was read at 595 nm.

Statistical analysis

All collected data were subjected to One Way ANOVA and means among treatments were compared by Tukey's test with $p < 0.05$.

Results

Effects of sludge application on soil

The main objective of this study was to follow an eventual leaching process of some sludge compounds after six weeks of larch culture. There was no difference in pH between the different treatments. However, the S2 treatment affected pH values slightly in the Ts and it became less acid compared to S1 (**Table 2**). In the same manner, no significant difference was observed between S1, S2 and the control concerning redox potential. The values of this parameter ranged between 356 and 434 mV.

Table 2: Mean \pm SE (n= 5) of pH, total nitrogen (mg g⁻¹DW), C:N ratio, total phosphorus (mg g⁻¹DW) and exchangeable fraction of copper (µg g⁻¹ DW) in the different soil horizons (Sl: Sludge level, Ts: top soil level, Bs: bottom soil layer) of control (C) and SS treated (S1: 30 Mg DW ha⁻¹ and S2: 60 Mg DW ha⁻¹). Values followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$).

		C	S1	S2
pH	Sl	-	6.4 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1
	Ts	5.0 \pm 0.4 ^a	5.0 \pm 0.2 ^a	5.4 \pm 0.1 ^a
	Bs	4.6 \pm 0.0 ^a	4.5 \pm 0.1 ^a	4.6 \pm 0.1 ^a
Total N mg g ⁻¹ DW	Sl	-	21.32 \pm 5.30	30.91 \pm 5.48
	Ts	1.48 \pm 0.06 ^a	2.28 \pm 0.25 ^b	3.33 \pm 0.26 ^c
	Bs	1.45 \pm 0.10 ^a	1.41 \pm 0.03 ^a	1.38 \pm 0.02 ^a
C:N	Sl	-	6.61 \pm 0.13	6.20 \pm 0.03
	Ts	17.60 \pm 1.60 ^a	11.30 \pm 1.78 ^b	9.16 \pm 0.71 ^b
	Bs	17.90 \pm 1.56 ^a	17.09 \pm 1.13 ^a	16.80 \pm 0.89 ^a
Total P mg g ⁻¹ DW	Sl	-	10.28 \pm 2.56	14.45 \pm 1.85
	Ts	0.62 \pm 0.04 ^a	1.40 \pm 0.51 ^b	2.75 \pm 0.35 ^c
	Bs	0.60 \pm 0.02 ^a	0.84 \pm 0.56 ^a	0.57 \pm 0.01 ^a
Exchangeable Cu µg g ⁻¹ DW	Sl	-	4.92 \pm 1.35	9.73 \pm 3.62
	Ts	0.11 \pm 0.05 ^a	0.26 \pm 0.05 ^b	0.53 \pm 0.15 ^c
	Bs	0.13 \pm 0.02 ^a	0.13 \pm 0.04 ^a	0.15 \pm 0.03 ^a

Carbon, nitrogen and phosphorus changes

The concentration of total N and P were compared for soil collected from horizons of untreated (C) and treated pots (S1 and S2). Large concentrations of N and P were observed within the sludge level (S1) of treated pots. The obtained results showed a significant enrichment of the Ts layers from S1 and S2 treatments compared to the control. Soil C:N ratios in Ts of S1 and S2 reflected a higher N concentrations and were significantly lower than control (**Table 2**), but no change was observed in bottom soil (Bs).

Heavy metal and mineral element changes

Figure 1 shows HM concentrations at different soil horizons. Sludge level (S1) of S1 and S2 treatments showed a higher value of Cu, Zn and Cd concentrations comparing with underlying horizons. In contrast, whatever the horizon, Pb values did not show any significant difference because soil used in this study contains initially a high level of Pb concentration. Cu and Zn were the most concentrated HMs present in the used sludge (**Table 1**). Their concentrations in Ts layer increased significantly only in S2 treatment (**Fig. 1**). However, exchangeable fraction of Cu increased in the Ts layer, at both S1 and S2 treatments (**Table 2**). For the same horizon, mineral element (K, Ca, Mg and Fe) concentrations did not show any significant difference between control (C), S1 and S2 treatments (**Fig. 2**).

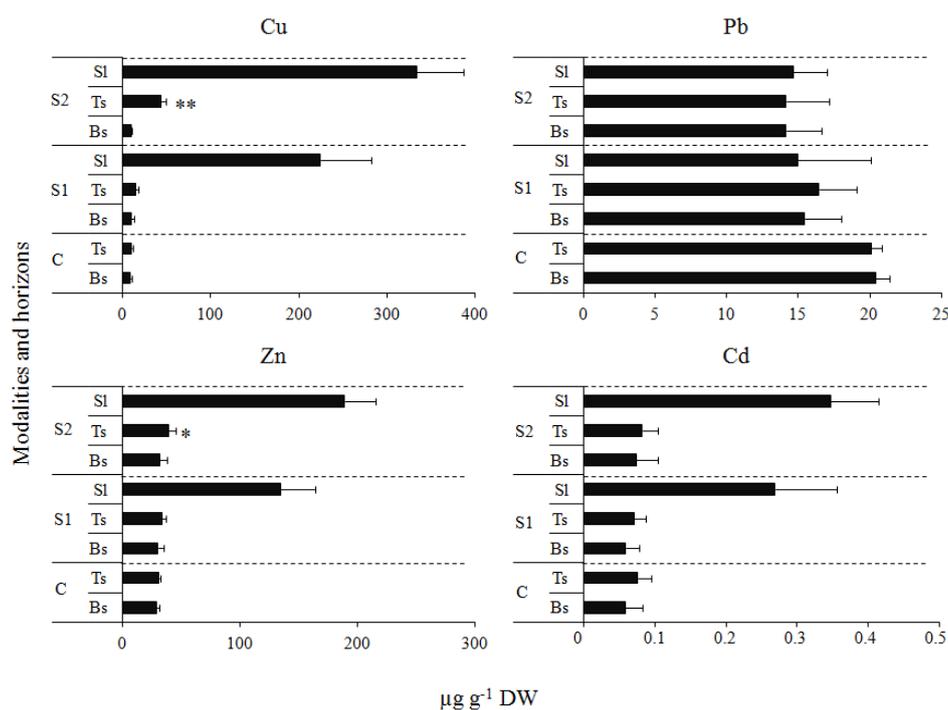


Figure 1: Heavy metal concentrations in $\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$ at the different soil horizons (S1: Sludge level, Ts: top soil level, Bs: bottom soil layer) of control (C) and SS treated (S1: 30 Mg DW ha^{-1} , S2: 60 Mg DW ha^{-1}) ($n=5$). ** $P<0.01$, * $P<0.05$, according to Tukey test.

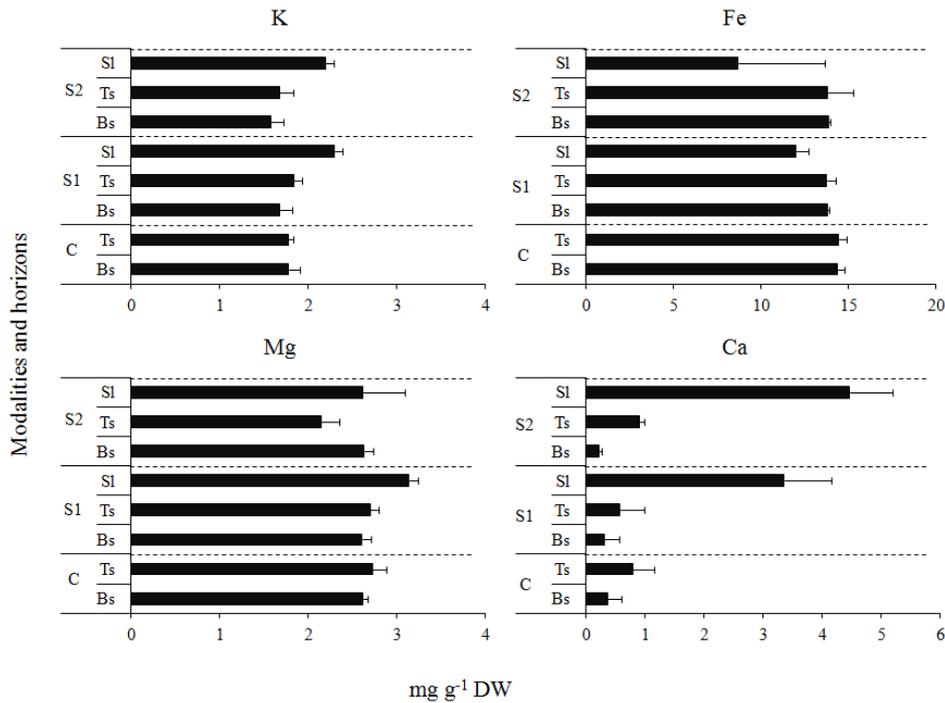


Figure 2: Mineral element concentrations in mg g⁻¹DW at the different soil horizons (Sl: Sludge level, Ts: top soil level, Bs: bottom soil layer) of control (C) and amended soil (S1: 30 Mg DW ha⁻¹, S2: 60 Mg DW ha⁻¹) (n=5).

Effects of sludge application on larch seedlings

Growth parameters

For control and S1 treatments, biomass accumulation increased in both aerial and underground parts when compared to T0 (**Fig. 3a**). In contrast, for the S2 treatment, only the AP biomass increased significantly (**Fig. 3a**). Unlike biomass accumulation parameter, shoot length was unaffected by sludge application even if we compare these results with the T0 harvest period. However, root length increased significantly only in C and S1 seedlings (**Fig. 3b**).

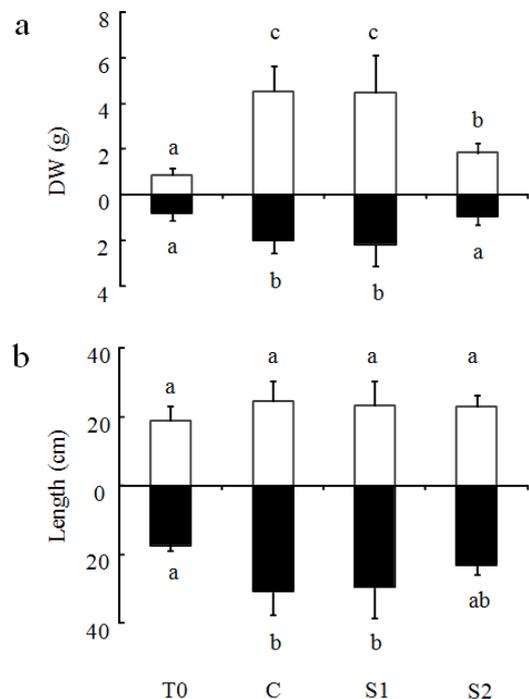


Figure 3 : Changes of (a) total dry matter partitioned to aerial part (white column) and root part (black column) and (b) shoot height (white column) and total root length (black column) of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha⁻¹, S2: 60 Mg DW ha⁻¹) after 6 weeks of growth. (n = 5), Different letters over columns indicate significant differences according to Tukey test at p < 0.05. Columns with the same letter are not significantly different. Vertical bars indicate standard error (±).

NR and SOD activities

As expected in coniferous tree, the NR activity is predominantly located in the needles (**Fig. 4**). After sludge application, NR activity in lateral roots was significantly reduced only for S2 seedlings while needle NR activity was significantly inhibited for both S1 and S2 treatments (**Fig. 4**). **Figure 5** showed an increase in root and needle SOD activities, enzyme involved in the detoxification pathway, when larch seedlings were exposed to S1 and S2 treatments. This increase was 4-fold higher than in the control treatment.

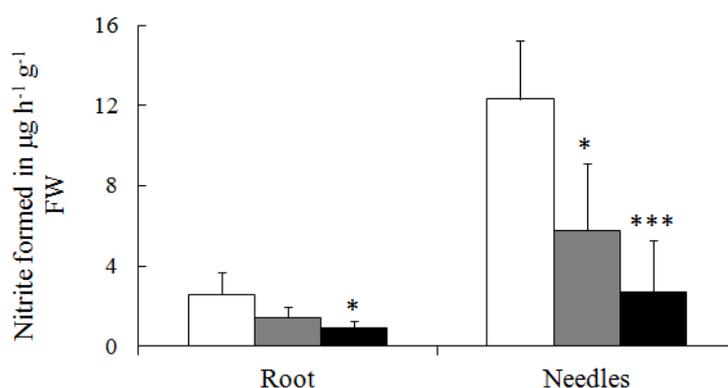


Figure 4: Changes in NR activity in needles (N_1) and lateral root (LR) of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) (white column) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha^{-1} (gray column), S2: 60 Mg DW ha^{-1} (black column)) after 6 weeks of growth. (n=5). Value with an asterisk are significantly different at * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ from those of the controls.

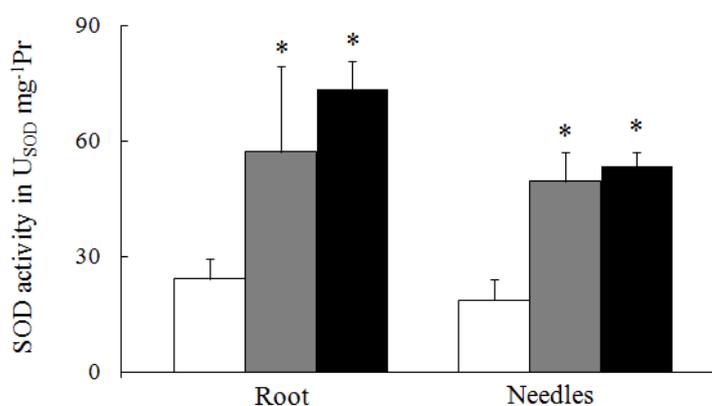


Figure 5: Changes in SOD activity in needles (N_1) and lateral root (LR) of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) (white column) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha^{-1} (gray column), S2: 60 Mg DW ha^{-1} (black column)) after 6 weeks of growth. (n=5). Value with an asterisk are significantly different at * $P < 0.05$ from those of the controls.

Nitrogen and phosphorus partitioning

A significant increase in nitrogen content (%) was observed in both needle and root in S2 seedlings, while no obvious effect could be observed for S1 treatment when compared to control (**Fig. 6**). Despite of the high concentrations observed in S2 plants, the total amount of

nitrogen in the whole plant (AP and RP) was lower than the measured one in control and S1 seedlings (**Table 3**). Young larch seedlings just issued from the nursery (T0) presented a high level of P in both AP and RP (**Fig. 7**). However, after 6 weeks of culture, P concentration in C, S1 and S2 seedlings decreased significantly and similarly in both AP and RP (**Fig. 7**). At the scale of the whole plant, only the S1 treatment showed an increase in P pool mainly at AP (**Table 3**). Control plants showed a stable pool of P in AP and a significant decrease in RP. As for S2 plants, despite the P enrichment by sludge application, a high significant decrease took place especially in RP compartment (**Table 3**). This decrease may account for the observed root growth inhibition in S2 seedlings.

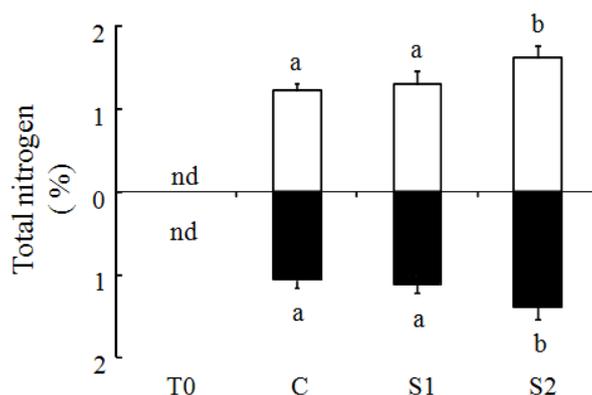


Figure 6: Nitrogen concentration in needles (N₁) (white column) and lateral root (LR) (black column) of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha⁻¹, S2: 60 Mg DW ha⁻¹) after 6 weeks of growth. (n = 5). T0: plant status before start of the experiment at day 0. Different letters over columns indicate significant differences according to Tukey test at p < 0.05. Columns with the same letter are not significantly different. Vertical bars indicate standard error (±).

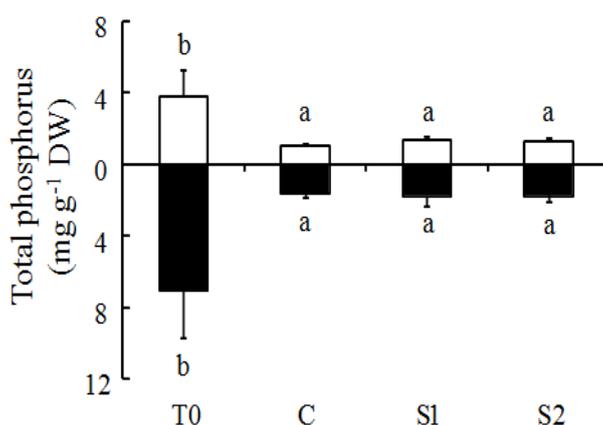


Figure 7: Total phosphorus concentration (mg g⁻¹ DW) in needles (N₁) (white column) and lateral root (LR) (black column) of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha⁻¹, S2: 60 Mg DW ha⁻¹) after 6 weeks of growth. (n = 5). T0: plant status before start of the experiment at day 0. Different letters over columns indicate significant differences according to Tukey test at p < 0.05. Columns with the same letter are not significantly different. Vertical bars indicate standard error (±).

Table 3: Macronutrient contents in aerial and root parts of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha⁻¹, S2: 60 Mg DW ha⁻¹) after 6 weeks of growth. T0: plant status before start of the experiment at day 0. Values followed by different letters differ significantly (P < 0.05).

		N ⁽²⁾	P	K	Mg	Ca	Fe
T0	AP	nd	3.88±0.53 ^a	7.20±0.91 ^a	1.24±0.08 ^a	1.95±0.15 ^a	0.04±0.00 ^a
	RP	nd	5.41±0.76 ^c	9.38±0.44 ^c	0.96±0.07 ^b	3.39±0.36 ^a	0.27±0.08 ^a
	T	nd	9.29±0.56 ^c	16.58±1.13 ^a	2.20±0.05 ^a	5.34±0.24 ^a	0.30±0.08 ^a
C	AP	39.51±11.12 ^b	4.14±0.54 ^a	26.08±2.33 ^d	4.38±0.76 ^b	7.56±0.51 ^b	0.72±0.06 ^c
	RP	15.36±3.69 ^a	2.93±0.56 ^b	7.98±0.43 ^{bc}	1.83±0.13 ^c	6.54±0.76 ^b	3.02±0.28 ^c
	T	54.87±14.75 ^b	7.08 ± 0.56 ^b	34.06 ± 2.43 ^c	6.22±0.63 ^b	14.10±0.77 ^c	3.74±0.27 ^c
	% ⁽¹⁾	nd	76.21	205.42	282.72	264.04	1246.67
S1	AP	39.39±11.86 ^b	7.15±1.08 ^b	20.57±0.39 ^c	3.13±0.30 ^c	8.44±0.46 ^b	2.22±0.09 ^d
	RP	19.40±7.74 ^a	4.30±0.64 ^{bc}	7.53±0.82 ^b	2.94±0.09 ^d	11.46±0.76 ^c	6.68±0.35 ^d
	T	58.78±19.39 ^b	11.45±0.83 ^d	28.10±0.96 ^b	6.07±0.32 ^b	19.90±0.66 ^d	8.90±0.42 ^d
	% ⁽¹⁾	nd	123.25	169.48	275.90	372.66	2966.67
S2	AP	19.08±6.51 ^a	2.62±0.53 ^a	13.36±1.51 ^b	1.10±0.02 ^a	2.99±0.65 ^a	0.48±0.02 ^b
	RP	10.85±2.73 ^a	1.22±0.13 ^a	2.50±0.39 ^a	0.33±0.03 ^a	4.46±0.90 ^a	1.57±0.10 ^b
	T	23.94±7.13 ^a	3.83±0.66 ^a	15.86±1.89 ^a	1.42±0.03 ^a	7.45±0.79 ^b	2.05±0.11 ^b
	% ⁽¹⁾	nd	41.22	95.65	64.54	139.51	683.33

AP: aerial part, RP: root part, T: total, ⁽¹⁾: % from T0, ⁽²⁾: Needles (AP) and Lateral root (RP).

Heavy metal and mineral element partitioning

The effect of SS application on K, Mg, Ca and Fe concentrations in AP and RP of larch plants were shown in **Figure 8**, while their total contents were given in **Table 3**. The changes in K and Mg concentrations in all plants followed the same trend as P. The levels of these both elements decreased significantly between T0 and the time of the final harvest, 6 weeks later. Only root seedlings of S2 treatment showed a significant higher Mg level to that measured at T0 (**Fig. 8**). However, at the scale of the whole seedling, the total K and Mg contents measured in both C and S1 seedlings were significantly higher than those assessed at T0 (**Table 3**). On the contrary, S2 seedlings presented similar values than those observed at T0 (**Table 3**).

In RP, Ca concentrations were about 2 times higher than in AP (**Fig. 8**). Excepted in RP of S1 seedlings, Ca concentration showed similar values for all treatments, and remained almost unaffected between T0 and the end of culture period (**Fig. 8**). Sludge application did not improve its content. Nevertheless, total Ca content at whole seedling was 2.6-fold and 3.7-fold higher than at T0 harvest period respectively for C and S1 treatments, while no significant increase was observed for S2 treatment (**Table 3**). Fe changes showed a particular case because its concentration (**Fig. 8**) and its total content (**Table 3**) increased significantly no matter the treatment. Even if the soil used in this study contains a high Fe concentration, it could be noticed that sludge application further enhanced Fe accumulation in both AP and RP, and this increase was the highest in S1 treatment.

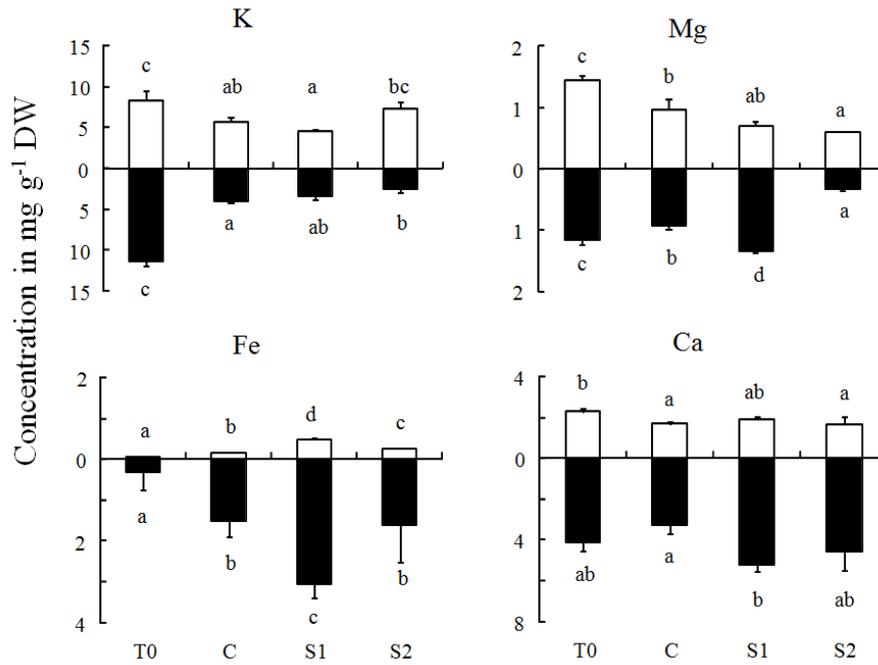


Figure 8: Concentration of mineral element in aerial part (white column) and root parts (black column) of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha⁻¹, S2: 60 Mg DW ha⁻¹) after 6 weeks of growth. (n = 5). T0: plant status before start of the experiment at day 0. Different letters over columns indicate significant differences according to Tukey test at p<0.05. Columns with the same letter are not significantly different. Vertical bars indicate standard error (±).

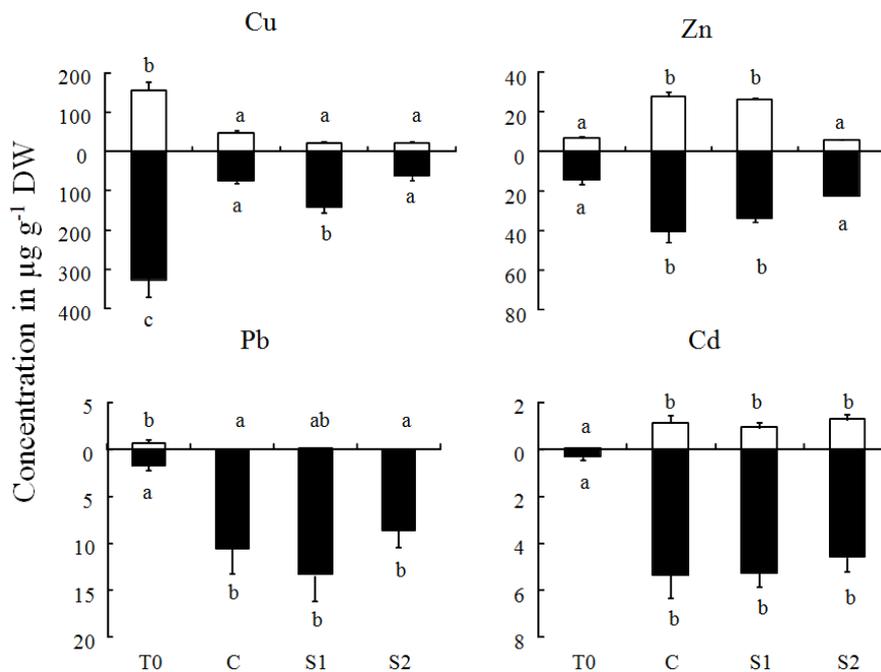


Figure 9: Concentration of heavy metals element in aerial part (white column) and root parts (black column) of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha⁻¹, S2: 60 Mg DW ha⁻¹) after 6 weeks of growth. (n = 5). T0: plant status before start of the experiment at day 0. Different letters over columns indicate significant differences according to Tukey test at p<0.05. Columns with the same letter are not significantly different. Vertical bars indicate standard error (±).

Table 4: Heavy metal contents in aerial and root parts of larch plants *Larix decidua* grown on control (C) and different sludge amended soil (S1: 30 Mg DW ha⁻¹, S2: 60 Mg DW ha⁻¹) after 6 weeks of growth. T0: plant status before start of the experiment at day 0. Values followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$).

		Cu	Zn	Pb	Cd	Cu + Zn + Pb + Cd	% Cu ⁽²⁾
T0	AP	136.05 ± 16.75 ^b	5.75 ± 0.61 ^a	0.54 ± 0.35 ^c	0.05 ± 0.01 ^a	142.40 ± 16.28 ^b	95.54
	RP	269.34 ± 36.78 ^c	11.77 ± 1.93 ^a	1.42 ± 0.43 ^a	0.30 ± 0.09 ^a	282.83 ± 36.39 ^b	95.23
	T	405.39 ± 53.18 ^b	17.53 ± 2.45 ^a	1.96 ± 0.24 ^a	0.35 ± 0.10 ^a	425.22 ± 52.32 ^b	95.33
C	AP	214.31 ± 31.50 ^c	126.66 ± 10.35 ^c	0.26 ± 0.04 ^b	5.29 ± 1.47 ^c	346.52 ± 42.86 ^d	61.84
	RP	149.35 ± 12.69 ^b	80.05 ± 11.88 ^c	20.93 ± 5.35 ^c	10.65 ± 1.96 ^c	260.98 ± 6.71 ^b	57.22
	T	363.65 ± 42.44 ^b	206.70 ± 4.23 ^c	21.20 ± 5.28 ^c	15.94 ± 3.37 ^c	607.50 ± 49.26 ^c	59.86
	% ⁽¹⁾	89.70	1179.12	1081.63	4554.28	142.86	
S1	AP	93.31 ± 18.05 ^{ab}	118.83 ± 2.91 ^c	0.49 ± 0.12 ^c	4.20 ± 1.01 ^c	216.82 ± 16.04 ^c	43.03
	RP	311.54 ± 29.25 ^c	74.30 ± 3.89 ^c	29.50 ± 5.93 ^c	11.52 ± 1.35 ^c	426.85 ± 40.08 ^c	72.98
	T	404.84 ± 37.28 ^b	193.13 ± 4.99 ^c	29.98 ± 5.85 ^c	15.72 ± 2.12 ^c	643.68 ± 46.54 ^c	62.89
	% ⁽¹⁾	99.86	1101.71	1529.59	4491.42	151.37	
S2	AP	42.18 ± 5.04 ^a	10.36 ± 1.37 ^b	0.08 ± 0.02 ^a	2.33 ± 0.39 ^b	54.94 ± 4.74 ^a	76.77
	RP	61.22 ± 10.88 ^a	21.89 ± 0.07 ^b	8.38 ± 1.75 ^b	4.48 ± 0.57 ^b	95.96 ± 10.87 ^a	63.79
	T	103.40 ± 9.55 ^a	32.25 ± 1.35 ^b	8.46 ± 1.78 ^b	6.80 ± 0.30 ^b	150.91 ± 9.24 ^a	68.51
	% ⁽¹⁾	25.50	183.97	431.63	1942.85	35.48	

AP: aerial part, RP: root part, T: total, ⁽¹⁾: % from T0, ⁽²⁾: % of Cu from total heavy metals (Cu+Zn+Pb+Cd).

HM concentrations and contents in plant parts were presented respectively in **Figure 9** and **Table 4**. Zn, Pb and Cd concentrations increased for all treatments when compared to T0 harvest period. So, this increase did not occur for Zn in S2 treatment and for Pb in the AP. Lead was accumulated only in RP of C, S1 and S2 seedlings (**Fig. 9**). Concerning Cd, its concentration increased significantly in both AP and RP with a mainly root accumulation (**Fig. 9**). When compared to T0 harvest period, the Zn, Pb and Cd contents in all plant parts increased significantly after 6 weeks of growth (**Table 4**). These increases were more pronounced in C and S1 treatment than in S2 treatment. The highest content was observed for Cd in C and S1 treatments (4.5-fold). In the case of Cu, the plant concentrations decreased largely for all treatments in comparison to T0 harvest period (**Fig. 9**). The contents in C and S1 plants were similar to those of T0 plants, while the levels in S2 plants were significantly lower (**Table 4**). After 6 weeks of growth, the percentage of Cu in the total amount of HMs was reduced significantly in all treatments (**Table 4**).

Discussion

The forest soil used in this work is fairly typical of French forest soils. It is a pseudo-Luvisol silty sandy clay with dysmull. It is acid, with a pH value of 4.7, corresponding to that type of soils (**Badeau et al. 1999**). It presents, like most of the forest soils, very moderate nitrogen content and a low P concentration, which make it unsuitable for crops, and always in agreement with what was mentioned earlier, the C:N ratio of 20.4 is consistent with the values commonly observed in the Luvisol.

The used sludge presents characteristics which are intermediate between liquid and pasty sludge. The dry matter of the applied sludge reached nearly 23 g L⁻¹ what explains the

slightly high values determined for the total organic matter content, the total nitrogen content and the total carbon content in comparison with some other sludge studied by **Singh and Agrawal (2008)** and **Egiarte et al. (2008)**. The pH value was also slightly acid compared to those commonly reported in SS; and like all sludge issued from urban waste water, our sludge contained HMs. The most represented metals were Cu and Zn but Cd and Pb were also present. Nevertheless, all HMs present showed concentrations lower than European standards, being Cu concentration the nearest one to the upper limit.

Nitrogen and phosphorus

Six weeks after the sludge application, the C:N ratio was significantly decreased in Ts of S1 and, in an even more pronounced manner in Ts of S2, while no modification appeared in Bs. This decrease was primarily due to the sludge high nitrogen supply. In fact, soil upper layers of both treatments were enriched in total nitrogen up to 1.54 times for S1 and up to 2.25 times for S2. No modification was observed in Bs, what signify it was no leaching from the top to the bottom of soil after six weeks. Very similar results have been obtained by **Mañas et al. (2010)** and **Egiarte et al. (2005)**, even after a longer culture time.

Sludge application had no effect on the pH of Ts as well as of Bs from the pots. Because of the sludge slightly higher pH value, one would have expected an increase in pH, at least in the upper layer and especially in S2 treatment. This is definitely not the case. Whether it is due to a small sludge addition to influence the whole soil pH, or due to an organic nitrogen mineralization start, it is difficult to assess. Indeed, mineralization induces soil acidification. But in acid soils like that used in our study, mineralization is less efficient than in more neutral soils (**Gill et al. 2011**). So, it therefore appears that we should favour the first hypothesis of a too weak sludge addition to have any effect on the soil pH. For the same reasons of acidity, nitrifying bacteria are scarce and nitrification is limited which finally implicate that the nitrogen resource available for the young larch must preferably be in the form NH_4^+ or of organic compounds.

Anyway, six weeks after sludge application, and whatever may be the N source used, there was an increase of the total N content in the larch plants of S2 treatment. The improvement of N content in N_1 as well as in LR is the consequence of an increased assimilation of N sources provided by the sludge and which had enriched the Ts layers of the pots. It is known that organic compounds especially amino-acid but also small peptides can be absorbed by plants (**Rentsch et al. 2007**). This is a quite possible assumption because the sludge is rich in organic nitrogen. Another form of N provided by the sludge is ammonia. This form has the advantage of being more easily assimilated than NO_3^- or organic compounds because of a lower cell energy cost. It is nevertheless toxic and depending on the species, plants are more or less able to use it (**Nicodemus et al. 2008**). However, woody gymnosperms, like larch, generally grow on acidic soils and have adapted mechanisms to use NH_4^+ preferentially (**Aarnes et al. 2007**). Finally, this hypothesis is supported by examination of the NR activity. In larch seedlings, the nitrate assimilation occurs preferentially in needles. Aside from the fact that each species has its preferred site of assimilation - at the leaf level or rather at the root level -, this preferentially leaf assimilation can be explained by its lower

energy cost. In fact, in leaves, nitrate reduction is powered mostly from direct products of photosynthesis while in roots, it implies an increase in root respiration rate (**Nicodemus et al. 2008**). The application of sludge results in a reduction of the NR activity. It is known that the addition of NH_4^+ can cause a decrease in NR activity (**Orebamjo and Stewart 1975**), particularly in the case of plants whose preferred N source is NH_4^+ . However, that decrease is not systematic. **Mohanty and Fletcher** have reported since **1976** that the efficiency of the NR is greater in the case of a mixed N supply, NH_4^+ and NO_3^- together. Nevertheless, it still seems likely that the decreased nitrate assimilation through NR observed in our work can be related to an increase of N supply by the sludge, mainly under NH_4^+ form.

Similarly at what observed for nitrogen, six weeks after the supply of sludge, the P content in the upper layers of S1 and S2 treatments increase, while the P content of underlying layers is not changed. Again, no leaching can be demonstrated to the bottom of the pot. P is found in soil and sludge in organic and inorganic form. P in the organic form is never directly available to plants. In soil, if we except the surface horizon including the litter, most of the P is in inorganic form. But only a weak fraction is still available to plants because of its more or less strong link to soil components (**Khanna et al. 2007**). The available P for plant nutrition is apprehended as close by the Olsen assay method. Thus, in the case of the soil from Mélisey, the bioavailable fraction of P is only 1.1 % of the total P present, and represents a concentration of $6.64 \mu\text{g P g}^{-1}$ of soil, what places this soil in the category of very poor soils at the limit of phosphate deficiency. In sludge, like in soil, there is evidence that the most of the P present is under the inorganic form (**Frossard et al. 1994, Singh and Agrawal 2008**). In the sludge used in this work, the Olsen P fraction represents 3.94 % from the total P measured. These data are consistent with those presented by **Smith et al. (2006)**. At the end of the six weeks of culture, the P status of the larch was different between the control plants and the S1 and S2 treated plants. In fact, the P rate of AP was 0.09 % in control treatment (reported to the dry matter) and 0.16 % and 0.14 % respectively for the S1 and S2 treatments. These values of 0.16 % and 0.14 % obtained in coniferous needles can be consider as satisfying taking into account the usual reported value of 0.2 % measured in the foliage of P well supplied deciduous trees (**Bonneau 1988**). On the contrary, the weak value of 0.09 % measured in control treatment reveals a P starvation. This is all the more amazing because larch seedlings purchased by the nursery contained very high quantities of P. Thus, the global per plant P content vary from $9.3 \text{ mg plant}^{-1}$ in the small just received young larches to $7.1 \text{ mg plant}^{-1}$ at the end of the six weeks of culture in the control treatment and $3.8 \text{ mg plant}^{-1}$ in the S2 treatment. Solely the S1 treated larches had accumulate P, reaching after 6 weeks the level of $11.5 \text{ mg plant}^{-1}$. It appears thus clearly that control and S2 treated plants have excreted some P at the root level. This phenomenon already described by many authors (**Fedorovskii 1958; Bielecki 1973; Elliott et al. 1984; Cogliatti and Santa Maria 1990 and Topa and Sisak 1997**) is not unusual and may occur every time when the P content of plants is high, as it was the case here at the beginning of the experiment. Taking the 6 weeks growth into account, it results that the global P concentration was significantly lower in control plants than in S1 treated plants. It appears also that the increased level of P in the upper layer of the treatment, consecutive to sludge addition, benefits to the seedlings. It is not so clear for the S2

seedlings which present an almost equal P content than the control plants. Nevertheless the scarce development of these plants has to be taken into account and will be discussed lower.

Other macronutrients and iron

Concerning K and Mg, the sludge application does not result, after 6 weeks, in an increase of their concentrations in the larch seedlings. Even if the K concentration in the sludge and in the superficial crust at the top of the S1 and the S2 pots were respectively 3.4 times and 2.2 times higher than in soil, it didn't translate into a significant enrichment of the top, even less of the under layers of soil after sludge spreading. Our results were, in that way, similar to those obtained by **Miah et al. (1999)** who mentioned the low fertilizing ability of sludge concerning K nutrition. Finally, at the end of the experiment, the K content in the whole plant did not differ significantly between the control and S1 nor S2 treated plants. Moreover, the K leaf concentration remained weak, around 0.5 % (excepted for S2 plants which case will be discussed lower), whereas the optimal K content is 0.7 % in larch needles according to **Bonneau (1988)**. This low concentration augurs perhaps a future K deficiency.

The Mg content was only 1.4 times greater in sludge than in soil and almost the same in the sludge crust, at the top of the S1 and S2 pots, than in their top soil layers. As a consequence, as in the case of K, there was no enrichment of the upper layers or of the bottom layers of the S1 and S2 pots. And thus it was not surprising that the Mg concentrations at the total seedling scale weren't significantly different between control and S1 plants. However it may be noticed that the Mg content in needles decreased between the beginning of the experiment and the end of the six weeks of culture. In control, S1 and S2 plants, the needles Mg contents were respectively of 0.09 %, 0.07 % and 0.06 %, a quite little value if one consider that (1) the optimal leaf content range between 0.15 % and 0.35 % (**Marschner 1995**) and (2) the initial young plants needles Mg content was around 0.14 %. In our case, the amendment by sludge does not seem able to compensate the widespread forest soils Mg deficiency.

The Ca content was 25 times greater in sludge than in soil and approximately 7.8 times greater in the sludge crust than in the top layers of the S1 and S2 treatments and that even if the used sludge wasn't limed. However, no enrichment of the upper nor of the under layer of the pots occurred. Nevertheless, a significantly higher content at the whole plant level was measured in the S1 treated seedlings, compared to the control ones whereas the Ca concentration of S2 treated plants tended to increase, even not significantly. This difference between control and S1 treated seedlings lies on the RP of plants. In S1 treated plants, the Ca root content was significantly greater than in control roots while there were no difference at the AP level. This accumulation of Ca in roots of sludge treated seedlings can be explained by its counterbalancing role against other ions like Cu^{2+} , Zn^{2+} and other metallic ions provided by sludge at the crust level and/or at the soil upper layer level. The role of Ca^{2+} in increasing the tolerance to metal ions like Cu^{2+} , Zn^{2+} or other divalent cations has long been known (**Marschner 1995**). According to **Wang et al. (2008; 2010)**, Ca^{2+} acts in two ways, firstly by decreasing the cell membrane surface electrical potential what diminish the attractiveness of membrane for divalent cations like Cu^{2+} , secondly by restoring metal displaced Ca^{2+} at the

membrane level. The increase in concentration of Ca in the root system of S1 and S2 treated plants could be considered as an indication of the establishment of a defence against accumulation of HM cations in the root.

The case of Fe is different again because it should be noticed that its concentration is especially high in the Mélisey soil. Even it is not unusual in forest soils (**Baize 1994**), it makes that the Fe supplied by the sludge was of scarce importance compared to the Fe naturally present. Anyway, after six weeks of culture for all treatments, the global Fe content at the whole plant level was significantly increased compared to the beginning of the experiment. The S1 treated seedlings contained significantly more Fe than the control plants what indicates a better absorption by the S1 treated seedlings. Most of the Fe absorbed remains at the root level (75 to 80 % of the quantity), but in S1 seedlings a substantial part of the absorbed Fe was translocated to AP. So, the AP content of control plants was almost 10 times lower than the RP content, while in S1 treated plants the Fe concentration of AP was only 6 times lower than the RP. In case of S1 treated plants, the Fe content of AP became critical if we take into account the toxicity threshold level of $500 \mu\text{g g}^{-1}$ DW reported by **Marschner (1995)**. Solely, the S2 treated seedlings presented a relatively low Fe content, lower than the concentrations measured in control and in S1 treated plants, but already significantly greater than the Fe concentration of the young seedlings at the beginning of the experiment. But this feature will be discussed later.

Finally, a special attention has to be paid on the plants of the S2 treatment. In fact, for the entire nutrient we were interested in, the S2 treated plants showed a significant difference with the control plants, and often with S1 treated plants. In many cases, their nutrient contents were lower than those measured in control plants. That was especially obvious for K; Mg and Ca in N_1 and LR, *i.e.* in the young organs in active growing state. For example, the K content of N_1 was almost 3 times lower in S2 treated plants than in plants grown in the control pots (data not shown). Figure 3 could provide some explanations for this phenomenon. Indeed, we can notice that if the AP development and the root development are similar in terms of length between the S1 and S2 treatments and the control, it is not the case for the dry matter change. The plants of the S2 treatment present only a scarce accumulation of dry matter between the beginning of the experiment (T0) and until the end of the sixth week of culture. On the contrary, plants of the S1 treatment, as well as the control plants, showed an entirely consistent development without any significant difference between them. The explanation lies in the sludge application. For S2, the amount of liquid sludge applied was so important that it induced few days waterlogging in pots. The return to normal soil oxygen concentration after treatment was thus delayed in S2 treatment. But it is known that under hypoxia, the normal root metabolism is greatly disturbed, inducing a reduced nutrient absorption ability (**Marschner 1995; Pezeshki 2001**). This transient absorption loss may explain the general weak nutrient accumulation observed in S2 treated plants. This is already supported by the very low Fe absorption observed in the S2 treated plants what can find an explanation in that transient waterlogging episode. It is in fact well known that hypoxia induced by waterlogging drastically affects Fe acquisition by the roots (**Pezeshki 2001**).

Micronutrients and HMs

The main HMs present in our study were Cu, Zn, Pb and Cd. Cu and Zn at low concentrations are microelements essential to plants while, on the contrary, Pb and Cd always have an anthropic origin and are of no use. Cu and Zn content in larch seedling were almost ten times greater than Pb and Cd contents, whatever the treatment considered. Apart from Cu, all metal concentrations increased in the seedlings between the beginning and the end of the experiment, whatever the treatment considered.

The Pb content of Mélisey's soil was naturally quite high and in any case close to that of sludge and no increase of Pb content was detected in the upper layers of the pots, in both treatments S1 and S2. Pb concentrations at the whole plant scale as well as at the AP or at the RP levels were very similar in control, S1 and S2 plants, at the end of the experiment. According to **Kabata-Pendias and Pendias (1992)** and to **Yoon et al. (2006)**, Pb was strongly sequestered in the RP where the concentration was almost 150 times higher than in the AP. The same repartition pattern occurred for Cd. Whatever the treatment, the Cd root content was approximately 5 times higher than in the shoot. These results were consistent with those obtained by **Lozano-Rodriguez (1997)**, **Grant et al. (2008)** and **Vaculík et al. (2012)**. The increase of Cd content throughout these six weeks of growth results from the absorption of the Cd present in the soil, for control treatment, and in the soil and the sludge for the S1 and S2 treatments. Even if the Cd concentration in sludge was about 9 times greater than that in the soil, the Cd content of the upper layers of the pots was not increased neither in S1 nor in S2. The same applies for the bottom layers of the S1 and S2 pots.

The Zn content of sludge was 9 times greater in sludge than in soil but unlike what observed for Cd, the upper layer of S2 treatment was significantly increased. But this increased soil level is not reflected by an increase in the Zn content in S2 plants, quite the contrary. In fact, as was previously underlined, S2 plants may have suffer from a transient hypoxic time in which absorption may have been greatly disturbed and it is then difficult to explain the poor Zn absorption observed in S2 treatment. As observed for Pb and Cd, Zn was preferentially stored at the root level, where the content was 1.5 and 1.3 times higher than at the AP for control and S1 treated plants respectively, but without any significant difference between them.

The case of Cu has to be considered separately. First, it must be noticed that the young larch seedlings just issued from the nursery presented a huge Cu content, $240 \mu\text{g g}^{-1}$ DW at the whole plant scale, and $158 \mu\text{g g}^{-1}$ DW at the foliage level. This value far exceeds the $20\text{--}30 \mu\text{g g}^{-1}$ DW toxicity threshold for crops established by **Marschner (1995)** and echoed by some other authors (**Kukkola et al. 2000**, **Adriaensen et al. 2005**, **Staszewski et al. 2012**). This state of affairs is probably due, at the nursery, to the massive use of Bordeaux mixture to protect young plants against attacks by pathogenic fungi. In the continuation of the experiment, throughout the six weeks of culture, it is noteworthy that the total amount of Cu present in the seedlings was not increased, even in the case of S1 and S2 treated plants which were however in presence of greatest among of bioavailable Cu in the upper layer of pots than control plants. No supplementary absorption of Cu took thus place. The Cu amount at the

whole plant level was even decreased in the case of S2 treated plants, probably consecutively to the necrosis of some lateral roots because of the brief waterlogging episode. Through that lack of supplementary Cu absorption and through the growth of plants, the Cu initially present was diluted, distributed all along the plant. As a consequence, the Cu concentrations decreased significantly during the six weeks of culture at the AP level as well as at the RP level, in control larches as well as in S1 and S2 treated larches. At the end of the experiment, the Cu concentrations at the whole plant scale were similar in control and in S1 treated plants ($56 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DW}$ vs $61 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DW}$ respectively) and even lower in S2 treated plants, for the reasons mentioned above. The S1 treated seedling even manage to reduce their Cu content of AP around $20 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DW}$, what was however not the case for control plants in which the Cu content of AP reached $47 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DW}$. In absence of real control series grown in the presence of a Cu concentration just sufficient to prevent deficiency, it is difficult to determine whether the larch seedlings are affected or not by these Cu contents. Many authors, **Wisniewski and Dickinson (2003)** working on *Quercus robur*, **Lombardi and Sebastiani (2005)** working on *Prunus cerasifera* and **Juang et al. (2012)** working on *Vitis vinifera* have reported similar Cu contents that do not, or little, affect plant development. Anyway, no acute or more discrete symptoms of Cu toxicity, *i.e.* brownish tip roots, chlorosis (**Arduini et al. 1995**) could be observed on larches of different treatments. It can also be noticed that in all treatments the Cu concentration was greater in the roots than in the AP, 2.1, 1.6 and 2.7 times for T0, control and S2 treatments respectively. In S1 this rate even reached 6.8 times, what was significantly different from all other treatments. The greatest Cu accumulation at the root level is a well known phenomenon what was already reported by many authors (**Arduini et al. 1996**, **Rossini Oliva et al. 2010**, **Juang et al. 2012**, **Branzini et al. 2012**). Some of the Cu was there located in the apoplast, while the other part enters the cell, without one can assess with certainty the exact ratio linked to wall compounds, and which probably depends on the plant species. What even it is, in our work, almost 66 % and 77 % of the Cu remained in roots for the young larches just issued from the nursery and for the S1 treated seedlings, respectively. These results were closed to those obtained by **Liao et al. (2000)** working on chicory. On the contrary, in control seedlings the main part of Cu was located in the shoot (59 %). Control and treated seedlings differed also in their ability to retain Cu at the root level where it buffers against high Cu content. The reasons for this difference remained unclear but one may suppose that a better N and/or P status like that observed in S1 plants, may influence on the whole plant nutrition and nutrient repartition which mean, by extension, on the xylem and phloem fluxes. Or, a Cu translocation in a complexed form was shown from roots to AP through the xylem (**Graham, 1979 and Liao et al. 2000**) and it was although demonstrated that a part of that ascendant Cu could be recirculated to root via the phloem flow **Liao et al. (2000)**. Thus, it could be hypothesized that the better mineral status of S1 seedlings could contribute to Cu sequestration at the root level and to the alleviation of an export to the aerial parts.

Finally, to conclude, in case of a multifactorial pollution by various HMs, it can be important to apprehend their concentration in a global way rather than considering them one by one, because of the numerous case of synergetic or, on the contrary, antagonistic effects reported by some authors (**He et al. 2004; Rossini Oliva et al. 2010**). While the overall HM

concentration was high in the nursery's plants ($252 \mu\text{g g}^{-1}$ DW at the whole plant level), it decreased after six weeks of culture to reach, in control and S1 seedlings, very closed values of the order of $90\text{-}95 \mu\text{g g}^{-1}$ DW at the whole plant level and even lowest value of $54 \mu\text{g g}^{-1}$ DW (at the whole plant level) in S2 treated plants, for already discussed previously. In the same span of time, the Cu proportion decreased from 95 % in nursery's plants to almost 60 % in control and S1 treated plants, while the concentrations of other HMs (*i.e.* Zn, Pb and Cd) increased from $12 \mu\text{g g}^{-1}$ DW at the whole plant level to about $37 \mu\text{g g}^{-1}$ DW and $36 \mu\text{g g}^{-1}$ DW in control and S1 treated plants respectively. There was no significant difference of total Zn, Pb and Cd content between control and S1 seedlings, at RP level as well as at AP level. Moreover these values are in the range of values considered as natural (**Zöttl 1990, Staszewski et al. 2012**). If one consider HMs in their globality, the most obvious discrepancy between control and treated plants consist in the highest Cu content in foliage of control seedlings compared to this one of S1 treated plants.

The examination of SOD activity, the key enzyme of detoxification pathway, allowed estimating the oxidative stress level in larches seedlings. Against all odds, while the SOD activity was only 24 U mg^{-1} protein and 18 U mg^{-1} protein in N_1 and in LR of control plants, it achieved 2.4 and 2.6 times these values in N_1 and in LR of S1 treated plants. In S2 treated plants, these values were respectively multiplied by 3 and 2.9 for N_1 and LR. In that latest case, the great SOD activity detected may partly found its explanation in the waterlogging and followed re-aeration episod. In fact, many authors reported an increased SOD activity during and mainly after hypoxic period (**Blokhina et al. 2003**). For S1 however, no or very light hypoxia took place within the few hours following sludge application, which could not in any case give rise to the observed SOD activity increase. HMs are although known to induce oxidative stress and might explain to some extent the SOD activity measured. However, because total HMs and especially Cu content were not significantly different between control and S1 treated plants, they cannot explain that increased SOD activity. In fact, the Cu concentration was approximately twice in N_1 from control larches than in N_1 from S1 treated larches but, however, the SOD activity was two times higher in S1 needles. It is therefore evident that oxidative stress developed in the S1 (and perhaps in the S2) seedlings was not related to the presence of HMs or Cu. As sludge contained a large range of contaminants including organic pollutants like herbicides residues, synthetic oestrogens, ...and because some authors reported induction of the oxidative pathway by these compounds, it is possible that some of these compounds are the source of that observed increased SOD activity.

Conclusion

In this study we observed that larch growth parameters were not affected, but other results (data not shown) showed a significantly increase in S1 and S2 treated plants compared to the control ones only after 6 months of culture. Thus, sludge spreading in forest lands resulted interesting from a firewood production perspective, considering the excellent biomass yields that can be obtained. This paper indicated, also, that HMs were less susceptible to leaching to soil depths. Although the benefits of municipal SS were well established and the risks involved were minimized, further studies are needed to determine the HMs behaviour in

soil-plant continuum at long term with special emphasis to assess the potential of their transfer to groundwater and along the food chain.

Acknowledgments

The authors are grateful to French Agency for Environment and Energy Management (ADEME-France), the Regional Council (Conseil régional) of Franche-Comté, and the Water Agency Rhône-Méditerranée & Corse (Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée & Corse) for financial support.

References

- Aarnes, H., Eriksen, A.B., Petersen, D., Rise F. (2007). Accumulation of ammonium in Norway spruce (*Picea abies*) seedlings measured by in vivo ¹⁴N-NMR. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 929–934.
- Adriaensen, K., Vralstad, T., Noben, J.-P, Vangronsveld, J., Colpaert, J.V. (2005). Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7279–7284.
- Arduini, I., Godbold, D.L., Onnis, A. (1995). Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Tree Physiology.*, 15(6), 411–415.
- Arduini, I., Godbold, D.L., Onnis, A. (1996). Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiologia Plantarum*, 97(1), 111–117.
- Badeau, V., Dambrine, E., Walter, C. (1999). Propriétés des sols forestiers français: Résultats du premier inventaire systématique. *Etude et gestion des sols*, 6(3), 165–180.
- Baize, D. (1994). Teneurs totales en "métaux lourds" dans les sols français. Premiers résultats du programme ASPITET. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA*, 22, 37-46
- Bastian, R.K., 2000. Seeing the future through the eyes of the past. In Henry, C.L., Harrison, R.B., Bastian, R.K., eds. The forest alternative for treatment and utilisation of municipal and industrial wastes. University of Washington Press, Seattle, Washington.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287.
- Bieleski, R.L. (1973). Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annual Review of Plant Physiology*, 24, 225–252.
- Billard, J.-P. & Langlois, J. (1986). Détermination in vivo de l'activité nitrate réductase des feuilles de haricot. *Biopedagos*, 1,42–50.

- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2), 179–194.
- Bonneau, M. (1988). Le diagnostique foliaire. *Revue forestière française*, doi : 10.4267/2042/25930.
- Bradford, N.M. (1976). A rapid and a sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*., 72(7), 248–254.
- Bramryd, T. (2001). Effects of liquid and dewatered sewage sludge applied to a scots pine stand (*Pinus sylvestris* L.) in Central Sweden. *Forest ecology and management* , 147(2-3), 197–216.
- Branzini, A., Santos González, R., Zubillaga, M. (2012). Absorption and translocation of copper, zinc and chromium by *Sesbania virgata*. *Journal of Environmental Management*, 102, 50–54.
- Breckle, S.W. & Kahle, H. (1992). Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant ecology*, 101(1), 43–53.
- Cogliatti, D.H. & Santa Maria, G. E. (1990). Influx and Efflux of Phosphorus in Roots of Wheat Plants in Non-Growth-Limiting Concentrations of Phosphorus. *Journal of Experimental Botany*, 41(5), 601–607.
- Council of the European Communities, (1999). The landfill directive (1999/31/EC). Official Journal of the European Communities. L 182,1–19.
- Egiarte, G., Camps Arbestain, M., Alonso, A., Ruiz-Romera, E., Pinto, M. (2005). Effect of repeated applications of sewage sludge on the fate of N in soils under Monterey pine stands. *Forest Ecology and Management*, 216(1-3), 257–269.
- Egiarte, G., Pinto, M., Ruiz-Romera, E., Camps Arbestain, M. (2008). Monitoring heavy metal concentrations in leachates from a forest soil subjected to repeated applications of sewage sludge. *Environmental Pollution*, 156(3), 840–848.
- Elliott, G.C., Lynch, J., Lauchli A. (1984). Influx and Efflux of P in Roots of Intact Maize Plants-Double-labeling with ³²P and ³³P. *Plant Physiology*, 76, 336–341.
- Fedorovskii, D.V. (1958). Secretion of labelled phosphorus and calcium from the root into the soil in root-fed plant. In : *Abstract of recent published material on soil and water conservation*. Department of agriculture. United States.
- Ferrier, R.C., Edward, A.C., Dutch, J., Wolstenholme, R., Mitchell, D.S. (1996). Sewage sludge as a fertilizer of pole stage forests: short-term hydrochemical fluxes and foliar response. *Soil Use Management*, 12, 1–7.

- Frossard, E., Tekely, P., Grimal, J.Y. (1994). Characterisation of phosphate species in urban sewage sludge by high-resolution solid-state ^{31}P NMR. *European Journal of Soil Science*, 45(4), 403–408.
- Fuchs, B., Track, C., Lang, S., Gimmler, H. (1997). Salt effects of processed municipal solid waste incinerator bottom ash on vegetation and underground water. *Angewandte Botanik*, 71(5-6), 154–163.
- Fuentes, D., Valdecantos, A., Cortina, J., Vallejo, V.R. (2007). Seedling performance in sewage sludge-amended degraded mediterranean woodlands. *Ecological engineering*, 31(4), 281–291.
- García-Delgado, M., Rodríguez-Cruz, M.S., Lorenzo, L.F., Arienzo, M., Sánchez-Martín, M.J. (2007). Seasonal and time variability of heavy metal content and of its chemical forms in sewage sludges from different wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 382(1), 82–92.
- Gil, M.V., Carballo, M.T., Calvo, L.F. (2011). Modelling N mineralization from bovine manure and sewage sludge composts. *Bioresource Technology*, 102(2), 863–871.
- Graham, R.D. (1979). Transport of copper and manganese to the xylem exudate of sunflower. *Plant, Cell and Environment*, 2(2), 139–143.
- Grant, C.A., Clarke, J.M., Duguid, S., Chaney, R.L. (2008). Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Science of the total environment*, 390(2-3), 301–310.
- He, P.P., Lv, X.Z., G.Y., Wang, G.Y. (2004). Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables. *Environment International*, 30, 167–172.
- Henry, C.L. & Cole, D.W. (1997). Use of biosolids in the forest: technology, economics and regulations. *Biomass Bioenergy*, 13(4), 269–277.
- Juang, K.W., Lee, Y.I., Lai, H.Y., Wang, C.H., Chen, B.C. (2012). Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(4), 1315–1322.
- Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. 1992. *Trace elements in soils and plants*. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kaposts, V., Kariņš, Z., Lazdiņš, A. (2000). Use of sewage sludge in forest cultivation. *baltic forestry*, 6(2), 24–28.
- Khanna, P.K., Bauhus, J., Meiwes, K.J., Kohler, M., Rumpf, S., Schönfelder, E. (2007). Assessment of changes in the phosphorus status of forest ecosystems in Germany: literature review and analysis of existing data. A report to the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection.

- Kimberley, M.O., Wang, H., Wilks, P. J., Fisher, C. R., Magesan, G. N. (2003). Economic analysis of growth response from a pine plantation forest applied with biosolids. *Forest Ecology and Management*, 189, 345–351.
- Kukkola, E., Rautio, P., Huttunen, S. (2000). Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 43(3), 197–210.
- Liao, M.T., Hedley, M.J., Woolley, D.J., Brooks, R.R., Nichols, M.A. (2000). Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rondy) plants grown in NFT system. I. Copper uptake and distribution in plants. *Plant and Soil*, 221(2), 135–142.
- Lombardi, L. & Sebastiani, L. (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science*, 168(3), 797-802.
- Lozano-Rodriguez, E., Hernandez, L.E., Bonay, P., Carpena-Ruiz, R.O. (1997). Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *Journal of Experimental Botany*, 48(306), 123–128.
- Mañas, P., Castro, E., Vila, P., de las Heras, J. (2010). Use of waste materials as nursery growing media for *Pinus halepensis* production. *European Journal of Forest Research*, 129(4), 521–530.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd Edition. Academic Press, San Diego.
- McGrath, S.P. & Cunliffe, C.H. (1985). A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 794–798.
- Miah, M.Y., Chiu, C.Y., Hayashi, H., Chino, M. (1999). Barley growth in response to potassium fertilization of soil with long-term application of sewage sludge. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45(2), 499–504.
- Mohanty, B. & Fletcher, J.S. (1976). Ammonium Influence on the Growth and Nitrate Reductase Activity of Paul's Scarlet Rose Suspension Cultures. *Plant Physiology*, 58(2), 152–155.
- Mosquera-Losada, M.R., Lopez-Diaz, L., Rigueiro-Rodriguez, A. (2001). Sewage sludge fertilisation of a silvopastoral system with pines in northwestern Spain. *Agroforestry System*, 53, 1–10.
- New Zealand Waste Water Association (NZWWA), (2003). Guidelines for the safe application of biosolids to land in New Zealand. NZWWA, Wellington.
- Nicodemus, M.A., Salifu, K.F., Jacobs, D.F. (2008). Nitrate reductase activity and nitrogen compounds in xylem exudate of *Juglans nigra* seedlings: relation to nitrogen source and supply. *Trees*, 22(5), 685–695.

- Oberley, L.W. & Spitz, D.R. (1985) Nitroblue tetrazolium. In: *CRC handbook of methods for oxygen radical research* (Greenwald R, ed), Boca Raton, FL: CRC.
- Orebanjo, T.O. & Stewart, G.R. (1975). Ammonium Inactivation of Nitrate Reductase in *Lemna minor* L. *Planta*, 122(1), 37–44.
- Pezeshki, S.R. (2001). Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 46(3), 299–312.
- Rentsch, D, Schmidt, S, Tegeder, M. (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters*, 581(12), 2281–2289.
- Rossini, Oliva, S., Mingorance, M.D., Valdés, B., Leidi, E.O. (2010). Uptake, localisation and physiological changes in response to copper excess in *Erica andevalensis*. *Plant Soil*, 328(1), 411–420.
- Singh, R.P. & Agrawal, M. (2008). Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, 28(2), 347–358.
- Smith, M.T.E., Cade-Menun, B.J., Tibbett, M. (2006). Soil phosphorus dynamics and phytoavailability from sewage sludge at different stages in a treatment stream. *Biology and Fertility of Soils*, 42(3), 186–197.
- Staszewski, T., Lukasik, W., Kubiesa, P. (2012). Contamination of Polish national parks with heavy metals. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(7), 4597–4608.
- Thomas, A.-L., Carnus, J.-M., Denaix, L., Gautry, J.-Y., Bailly, A., Thiberville, F. (2004). Le réseau « ERESFOR » : Epanchage de Produits Résiduaux sur Parcelles Forestières. Dispositifs expérimentaux et outils d'acquisition de références agro-environnementales : Retour au sol des matières organiques. <https://www.bordeaux.inra.fr/eresfor/biblio/collademe2004.pdf>. accessed 26 November 2012.
- Topa M.A. & Sisak C.L. (1997). Characterization of phosphorus uptake in slow- and fast-growing southern pine seedlings grown in solution culture. *Plant and Soil*, 190, 317–329.
- UK Department of the Environment (UK DoE), (1989; Revised 1996). Code of practice for agricultural use of sewage sludge. HMSO, London.
- United States Environment Protection Agency (US EPA), (1993). Standards for use and disposal of sewage sludge. *Federal Register*, 58, 9387–9404.
- Vaculík, M., Konlechner, C., Langer, I., Adlassnig, W., Puschenreiter, M., Lux, A., Hauser, M.-T. (2012). Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. *Environmental Pollution*, 163, 117–126.

- Wang, P., Zhou, D.M., Kinraide, T.B., Luo, X., Li, L., Li, D., Zhang, H. (2008). Cell Membrane Surface Potential (Ψ_0) Plays a Dominant Role in the Phytotoxicity of Copper and Arsenate. *Plant Physiology*, 148(4), 2134–2143.
- Wang, P., Zhou, D.M., Peijnenburg, W.J.G.M., Lian-Zhen, Li, L.Z., Weng, N. (2010). Evaluating mechanisms for plant-ion (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} or Ni^{2+}) interactions and their effectiveness on rhizotoxicity. *Plant Soil*, 334(1-2), 277–288.
- Wisniewski, L. & Dickinson, N.M. (2003). Toxicity of copper to *Quercus robur* (English Oak) seedlings from a copper-rich soil. *Environmental and Experimental Botany*, 50(1), 99–107.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, Q.L. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*, 368, 456–464.
- Zöttl, H.W. (1990). Ernährung und Düngung der Fichte. *Forstwissenschaftliches Centralblatt*, 109(1), 130–137.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarnes H., Eriksen A.B., Petersen D. & Rise F., 2007. Accumulation of ammonium in Norway spruce (*Picea abies*) seedlings measured by in vivo ¹⁴N-NMR. *Journal of Experimental Botany*, 58: 929-934.
- ADEME, 2001. Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture - dossier documentaire, Angers, France.
- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), 2008. Réutilisation des eaux usées traitées pour l'arrosage ou l'irrigation. 69p.
- Agbenin J.O. & Olojo L.A., 2004. Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter. *Geoderma*, 119: 257-265.
- Ahmad I., Naeem M., Khan N.A. & samiullah, 2009. Effects of cadmium stress upon activities of antioxidative enzymes, photosynthetic rate, and production of phytochelatins in leaves and chloroplasts of wheat cultivars differing in yield potential. *Photosynthetica*, 47: 146-151.
- Alloway B.J., 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, London, 2nd Edition, 368 p.
- Ambus P., Kure L.K. & Jensen E.S., 2002. Gross N transformation rates after application of household compost or domestic sewage sludge to agricultural soil. *Agronomie*, 22:723-730.
- Antolin M.C., Muro I. & Sánchez-Díaz M., 2010. Application of sewage sludge improves growth, photosynthesis and antioxidant activities of nodulated Alfalfa plants under drought conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 68: 75-82.
- Archie S.G. & Smith M., 1981. Survival and growth of plantations in sewage sludge treated soil and older forest growth studies. *Municipal Sludge Application to Pacific North-West forest lands*. 41: 105-113. Edited by C.B. Bledose. University of Washington, College of Forest Resources.
- Arias M., Pérez-Novo C., López E. & Soto B., 2006. Competitive adsorption and desorption of copper and zinc in acid soils. *Geoderma*, 133: 151-159.
- Aussenac G. & El Nour M., 1986. Reprise des plants et stress hydriques. Centre de recherche forestière-INRA Champenoux.
- Bahri A., 1992. Impacts d'un épandage de boues résiduaires urbaines sur le fonctionnement hydraulique d'un réseau de drainage et sur la qualité des eaux de drainage. *Science du sol*, 30: 57-74.
- Bailly A., Gautry J.Y., Carnus J.M. & Benbrahim M., 2004. Etat de l'art sur l'épandage en forêt des boues de stations d'épuration urbaine et de boues de papeteries : marchés AFOCEL-ADEME n°99 75060 AFOCEL, Association Forêt-Cellulose (FRA), 72p.

- Baize D. & Tercé M., 2002. Un point sur les éléments traces métalliques dans les sols : approches fonctionnelles et spatiales. Edition INRA-Paris.
- Baize D., Courbe C., Suc O., Schwartz C., Tercé M., Bispo A., Sterckman T. & Ciesielski H., 2006. Epandages de boues d'épuration urbaines sur des terres agricoles : impacts sur la composition en éléments en traces des sols et des grains de blé tendre. Courrier de l'environnement de l'INRA n°53.
- Banerjee M.R., Burton D.L. & Depoe S., 1997. Impact of sewage sludge application on soil biological. Characteristics. Agriculture. Ecosystems and Environment, 66: 241-249.
- Barles S., 2005. L'invention des déchets urbains France : 1790-1970. Edition Champ Vallon.
- Barnes J.D., Balaguer L., Manrique E., Elvira S. & Davison A.W., 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of Chlorophylls a and b in lichens and higher plants. Environmental and experimental botany, 32:85-100.
- Barzegar A.R., Yousefi A. & Daryashenas A., 2002. The effect of addition of different amounts and types of organic materials on soil physical properties and yield of wheat. Plant Soil, 247: 295-301.
- Bascoul V., Décembre 2000. Des épandages pour la protection de la forêt contre l'incendie *in* : Que faire des boues ? Une approche socio-économique du club Environnement et société. Ecrin.
- Beauchamp C. & Fridovich I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44:276-287.
- Beeby A. & Richmond L., 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. Ecological Indicators 1: 261-270.
- Benbrahim M., Denaix L., Carnus J.-M., Timbal J., Chossat J.-C., Scheifler R., Gomot de Vaufleury A., Badot P.-M., Tricot A. & Lolive J., 2003. Effets environnementaux des épandages de boues de station d'épuration en plantation de pin maritime. Dans : Agriculture et épandage de déchets urbains et agro-industriels. Les Dossiers de l'environnement de l'INRA, 25, Paris, pp. 35-44
- Beyersmann D. & Hechtenberg S., 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. Toxicology and Applied Pharmacology, 144: 247-261.
- Bhattacharya T., Chakraborty S. & Banerjee D.K., 2010. Heavy metal uptake and its effect on macronutrients, chlorophyll, protein, and peroxidase activity of *Paspalum distichum* grown on sludge-dosed soils, Heavy metal uptake and its effect on *P. distichum*. Environmental monitoring and assessment, 169:15-26.
- Bhogal A., Nicholson F.A., Chambers B.J. & Shepherd M.A., 2003. Effects of past sewage sludge on heavy metal availability in light textured soils: implications for crop yields and metal uptakes. Environmental Pollution, 121: 413-423.

- Billard J.-P. & Langlois J., 1986. Détermination in vivo de l'activité nitrate réductase des feuilles de haricot. *Biopedagos*, 1: 42-50.
- Bipfubusa M., N'Dayegamiye A. & Antoun H., 2006. Evaluation des effets de boues mixtes fraîches et de leurs composts sur les rendements des cultures et leur nutrition minérale. *Agrosolutions* 17 :65-72.
- Blanchard C., 2000. Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.
- Bonneau M., 1988. Le diagnostic foliaire. *Revue forestière française*, 40: 19-28.
- Bonneau M., 1995. Fertilisation des forêts dans les pays tempérés. Editions ENGREF, 367 p.
- Bramryd T., 2001. Effects of liquid and dewatered sewage sludge applied Scots pine stand (*Pinus sylvestris* L.) in central Sweden. *Forest ecology and management*, 147: 197-216.
- Bridgham S. D., Updegraff K. & Pastor J., 2001. A comparison of nutrient availability indices along an ombrotrophic-minerotrophic gradient in Minnesota Wetlands. *Soil Science Society of America Journal*, 65: 259-269.
- Brossard M., Mench M. Clairon M. & Laurent J.Y., 1991. Évolution à court terme de formes du phosphore d'un sol ferrallitique après apports d'une boue urbaine. *Agronomie*, 11: 699-706.
- Buffet M., 2010. Analyse sur la Situation du Recyclage Agricole des Boues Résiduairees en Europe. Mémoire de fin d'études présenté pour l'obtention du Mastère Spécialisé « Gestion, Traitement et Valorisation des Déchets », Option Déchets Industriels, 53p.
- Cadillon M., 1995. La valorisation de boues de stations d'épuration pour le reboisement en contexte méditerranéen : les principaux enseignements des expérimentations menées par la Société du Canal de Provence ». In : *Les Boues de stations d'épuration urbaines*, ENGREF-CEMAGREF Editions, pp 251-267.
- Cala V., Cases M.A. & Walter I., 2005. Biomass production and heavy metal content of *Rosmarinus officinalis* grown on organic waste amended soil. *Journal of Arid Environments*, 62: 401-412.
- Camargo I.M.C., Hiromoto G. & Flues M., 2007. Heavy metal partition in acid soils contaminated by coal power plant. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 4: 831-837.
- Campagna M., 1996. Le cycle du carbone et la forêt : de la photosynthèse aux produits forestiers, direction de l'environnement forestier : service de l'évaluation environnementale. Ministère des ressources naturelles, Québec.
- Carbonell G., Pro J., Gomez N., Babin M.M., Fernandez C., Alonso E. & Tarazona J.V., 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1309-1319

- Cavallaro N. & McBride, M.B., 1984. Zinc and copper sorption and fixation by an acid soil clay: Effect of selective dissolutions. *Soil Science Society of America Journal*, 48:1050-1054.
- Chaney R.L., 1990. Twenty years of land application research. *Biocycle*, 31: 54-59.
- Chaussod R., Germon J.C. & Catroux G., 1981. Essai de détermination au laboratoire de l'aptitude à la minéralisation d'azote des boues résiduelles urbaines. *Compte Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 67:762-771.
- Cheeseman J.M. & Wickens L.K., 1986. Control of Na and K transport in *Spergularia marina* (III) Relationship between ion uptake and growth at moderate salinity. *Physiologia Plantarum* 67: 15-22.
- Coeurdassier M., Gomot-de Vaufleury A., Lovy C. & Badot P.-M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53:425-431.
- Couillard D. & Grenier Y., 1989. Effect of applications of sewage sludge on N, P, K, Ca, Mg and trace element contents of plant tissues. *The Science of the Total Environment*, 80: 113-125.
- Couillard D., 1989. Élimination des boues résiduelles urbaines par la fertilisation sylvicole. *Canadian journal of civil engineering*, 16: 650-660.
- Cui X. & Song J., 2007. Soil $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ nitrogen characteristics in primary forests and the adaptability of some coniferous species. *Frontiers of Forestry in China*, 2: 1-10.
- Dallinger R., Berger B., Triebkorn-Köhler R. & Köhler H., 2001. Soil biology and ecotoxicology, in: Barker, G.M. (Ed.), *The biology of terrestrial molluscs*. CAB International, Wallingford, pp. 489-525.
- De Vaufleury A., Fritsch C, Gimbert F., Pauget B., Coeurdassier M., Crini N. & Scheifler R., 2009. Utilisation et intérêts des escargots et des micromammifères pour la bioindication de la qualité des sols. *Etude et gestion des sols*, 16: 203-217.
- Deneux-Mustin S., Roussel-Debet S., Mustin C., Henner P., Munier-Lamy C., Colle C., Berthelin J., Garnier-Laplace J. & Leyval C., 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. *TEC & DOC*, Paris.
- Doroshkevich S.G. & Badmaev A.B., 2008. Accumulation of heavy metals in the soil-plant system under the application of increasing doses of sewage sediments. *Contemporary Problems of Ecology*, 1: 361-366.
- Dousset S., Morel J.L. & Wiart J., 1999. Influence du chaulage sur la biodisponibilité des éléments métalliques en trace incorporés au sol lors de l'épandage de boues de stations d'épuration. *Etude et Gestion des Sols*, 6: 105-114.

- Drazkiewicz M., Skorzynska-Polit E. & Krupa Z., 2007. The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. *Chemosphere*, 67: 188-193.
- Driever S.M., Van Nes E.H. & Roijackers R.M.M., 2005. Growth limitation of *Lemna minor* (L.) due to high plant density. *Aquatic Botany*, 81: 245-251.
- Duchaufour P., 1977. Pédogénèse et classification pédologique (II).Edition Masson. Paris, 477p.
- Duchaufour P., septembre 1950. L'humus forestier et les facteurs de sa décomposition. *Revue forestière française*, pp. 479-488.
- Duguet F., 2005. Mineralisation de l'azote et du phosphore dans les sols organiques cultivés du sud-ouest du Québec. Mémoire-faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation-Université Laval.
- Egiarte G., Camps Arbostain M., Alonso A., Ruiz-Romera E. & Pinto M., 2005. Effect of repeated applications of sewage sludge on the fate of N in soils under Monterey pine stands. *Forest Ecology and Management*, 216: 257-269.
- Epstein E., Taylor J.M. & Chaney R.L., 1976. Effects of sewage sludge and sludge compost applied to soil on some soil physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality*, 5: 422-426.
- Ferrier R.C., Edward A.C., Dutch J., Wolstenholme R. & Mitchell D.S., 1996. Sewage sludge as a fertilizer of pole stage forests: short-term hydrochemical fluxes and foliar response. *Soil Use and Management*, 12: 1-7.
- Ferstler V., 2010. Les filières de gestion des boues issues du traitement des eaux usées. MEEDDM (Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de la Mer), Direction de l'eau et de la biodiversité.
- Fliessbach A., Martens R. & Reber H.H., 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1201-1205.
- Fridovich I., 1986. Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 58:61-97.
- Frossard E., Tekely P. & Grimal J.Y., 1994. Characterisation of phosphate species in urban sewage sludge by high-resolution solid-state ³¹P NMR. *European Journal of Soil Science*, 45: 403-408.
- Fuentes D., Valdecantos A., Cortina J. & Vallejo V.R., 2007. Seedling performance in sewage sludge-amended degraded mediterranean woodlands. *Ecological engineering*, 31: 281-291.

- Fulton A. & Meyer R.D., 2010. Understanding and Applying Information from a Soil Test *in* fruit and nut notes (volume 11). University of California.
- García-Delgado M., Rodríguez-Cruz M. S., Lorenzo L. F., Arienzo M. & Sánchez-Martín M. J., 2007. Seasonal and time variability of heavy metal content and of its chemical forms in sewage sludge from different wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 382: 82-92.
- Gérard B., Alaoui-Sossé B. & Badot P.-M., 2009. Flooding effects on starch partitioning during early growth of two oak species. *Trees - Structure and Function*, 23: 373-380.
- Gibert O., de Pablo J., Cortina J.L. & Ayora C., 2005. Municipal compost-based mixture for acid mine drainage bioremediation: Metal retention mechanisms. *Applied Geochemistry*, 20:1648-1657.
- Gigliotti G., Kaiser K., Guggenberger G. & Haumaier L., 2002. Differences in the chemical composition of dissolved organic matter from waste material of different sources. *Biology and Fertility of Soils*, 36:321- 329.
- Gimbert F., de Vaufléury A., Douay F., Coeurdassier M., Scheifler R. & Badot P.-M., 2008a. Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soil in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 138-146.
- Gimbert F., Vijver M.G., Coeurdassier M., Scheifler R., Peijnenburg W.J., Badot P.-M., de Vaufléury A., 2008b. How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 1284-1292.
- Giroux M. & Audesse P., 2004. Comparaison de deux méthodes de détermination des teneurs en carbone organique, en azote total et du rapport C/N de divers amendements organiques et engrais de ferme. *Agrosol Productions animales*, 15: 107-110.
- Gomez E., Bachelot M., Munaron D., Chiron S., Casellas C. & Fenet H., 2011. Les résidus de médicaments et de produits de soins en milieu côtier : existe-t-il un risque de bioaccumulation ? Comm. Orale-SEFA (société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée). Muséum national d'histoire naturelle.
- Gomot A., 1997. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33:209-216.
- Gomot de Vaufléury A. & Pihan F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere*, 40: 275-284.
- Gomot-de Vaufléury A. & Kerhoas I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64:434-442.

- Greger M., 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. *In*: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-27.
- Guivarch A., 2001. Valeur fertilisante à court terme du phosphore des boues de stations d'épuration urbaines. Thèse : Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 274 p.
- Hainry D. & Colombet M., 2010. Bilan des introductions et perspectives d'utilisation des Mélèzes d'EUROPE (*Larix decidua*), du Japon (*Larix Kaempferi*) et hybride (*Larix eurolepis*) en Bretagne. Centre régional de la propriété forestière de Bretagne.
- Harris G.L., Goss M.J., Dowdell R.J., Howse K.R. & Morgan P., 1984. A study of mole drainage with simplified cultivation for autumn - sown crops on a clay soil. 2. Soil water regimes, water balances and nutrient loss in drain water, 1978-80. *The Journal of Agricultural Science*, 102, 561-581.
- Hatira A., Gallali T., Rouiller J. & Guillet B., 1990. Stabilité et solubilité des complexes formés entre le cuivre, le plomb, le zinc et les acides fulviques. *Science du sol*, 28: 123-135.
- He P. & Jin J.Y., 1999. Relationships among hormone changes, transmembrane flux of Ca^{2+} and lipid peroxidation during leaf senescing in spring maize. *Acta Botanica Sinica*, 41: 1221-1225.
- Heikens A., Peijnenburg W.J.G.M. & Hendriks A.J., 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*, 113: 385-393.
- Henry C.L. & Cole D.W., 1986. Pack Forest sludge demonstration program: History and current activities. *In* The forest alternative for treatment and utilization of municipal and industrial wastes. Edited by Cole D.W., Henry C.L., Nutter, W.L. University of Washington Press, Seattle, pp. 461-471.
- Henry C.L. & Cole D.W., 1997. Use of biosolids in the forest: technology, economics and regulations. *Biomass Bioenergy*, 13: 269-277.
- Henry C.L., Harrison R.B. & Bastian R.K., 2000. The forest alternative: principles and practices of residuals Use. College of Forest Resources, Univ. of Washington, Seattle, WA. USA, 237 p.
- Hernandez T., Moral R., Perez-Espinosa A., Moreno-Caselles J., Perez-Murcia M.D. & Garciaa C., 2002. Nitrogen mineralisation potential in calcareous soils amended with sewage sludge. *Bioresource Technology*, 83: 213-219.
- Hernandez T., Moreno J.I. & Costa F., 1991. Influence of sewage sludge application on crop yields and heavy metal availability. *Soil Science and Plant Nutrition*, 37: 201-210.

- Hooda P.S. & Alloway B.J., 1993. Effects of time and temperature on the bioavailability of Cd and Pb from sludge amended soils. *Journal of Soil Science*, 44: 97-110.
- Horswell J., Weitz H. J., Percival H.J. & Speir T.W., 2006. Impact of heavy metal amended sewage sludge on forest soils as assessed by bacterial and fungal biosensors. *Biology and fertility of soils*, 42: 569-576.
- Houba V.J.G., Novozamsky I., Lexmond T.M. & Van Der Lee J.J., 1990. Applicability of 0,01 M CaCl₂ as a single extraction solution for the assessment of the nutrient status of soils and other diagnostic purposes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 21:2281-2290.
- Hue N.V. & Ranjith S.A., 1994. Sewage sludge in Hawaii: chemical composition and reactions with soils and plants. *Water, Air & Soil Pollution*, 72: 265-283.
- Hussein A.H.A., 2009. Impact of sewage sludge as organic manure on some soil properties, growth, yield and nutrient contents of cucumber crop. *Journal of Applied Sciences*, 9:1401-1411.
- Hussein Kh. A., Hassan A.F. & Abdel-Hady E.S, 2010. Study of sewage sludge use in agriculture and its effect on plant and soil. *Agriculture And Biology Journal Of North America*, 1: 1044-1049.
- Hyun H., Chang A.C., Parker D.R. & Page A.L., 1998. Cadmium solubility and phytoavailability in sludge-treated soil: effects of soil organic matter. *Journal of Environmental Quality*, 27: 329-334.
- Imai T., Li B., Reungsang A. & Kaewkannetra P., 2010. Effects of mineral nutrients with biowaste compost as soil conditioner for farmland. *KKU Research Journal*, 15: 818-825.
- Impens R. & Avril C., 1992. Code de bonnes pratiques pour l'utilisation en agriculture de fertilisants et amendements riches en cadmium. Note de synthèse. Unité d'Enseignement et de recherche de biologie végétale. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique, Juin. 76p.
- ISO 15952, 2006. Soil quality. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Standardisation Organisation? Geneva, Switzerland.
- ISO 20079, 2005. Water quality- Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test. Geneva, Switzerland.
- Jalali M. & Khanlari Z.V., 2006. Mobility and distribution of zinc, cadmium and lead in calcareous soils receiving spiked sewage sludge. *Soil & Sediment Contamination*, 15: 603-620.

- Jama A. & Nowak W., 2012. Willow (*Salix viminalis* L.) in purifying sewage sludge treated soils. Polish Journal of Agronomy, 9: 3-6.
- Janzen H. H., 1987. Soil organic matter after long term cropping to various spring wheat rotations. Canadian Journal of Soil Science, 67: 845-856.
- Jarauschk-Wehrheim B., Mocquot B. & Mench M., 1996. Uptake and partitioning of sludge borne copper in field-grown maize (*Zea mays* L.). Environmental Pollution, 5: 259-271.
- Jauzein M., 1995. Les micro-polluants organiques dans les boues résiduares des stations d'épuration. Publication ADEME, 220 p.
- Jess S. & Marks R.J., 1998. Effect of temperature and photoperiod on growth and reproduction of *Helix aspersa* var. *maxima*. Journal of Agricultural Science, 130: 367-372.
- Jiang C.Z., Rodermeil S.R. & Shibles R.M., 1993. Photosynthesis, RubisCO activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. Plant Physiology, 101: 105-112.
- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M. & Mocquot B., 1995. Les micropolluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines. ADEME Editions (Paris), 209 p.
- Kabata-Pendias A. & Pendias H., 1992. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2nd Edition, 209 p.
- Kalač P. & Svoboda L., 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms, Food Chemistry, 69: 273-281.
- Karboulewsky N., Dupouyet S. & Bonin G., 2002. Environmental risks of applying sewage sludge compost to vineyards. Carbon, heavy metals, and phosphorus accumulation. Journal of Environmental Quality, 31: 1522-1527.
- Kassaoui H., Lebdiri M., Lebdiri A., Rifi E., Badoc A. & Douira A., 2009. Bioaccumulation de métaux lourds chez la tomate et la laitue fertilisées par les boues d'une station d'épuration. Bulletin de la Société de Pharmacie-Bordeaux, 148: 77-92.
- Keddy C.J., Greene J.C. & Bonnell M.A., 1995. Review of whole-organism bioassays: Soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. Ecotoxicology Environmental Safety, 30: 221-251.
- Khan F.A. & Ansari A.A., 2005. Eutrophication: An Ecological Vision. The Botanical Review, 71: 449-482.
- Khanna P.K., Bauhus J., Meiwes K.J., Kohler M., Rumpf S. & Schönfelder E., 2007. Assessment of changes in the phosphorus status of forest ecosystems in Germany: literature review and analysis of existing data. A report to the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection.

- Kim B. & McBride M.B., 2006. A test of sequential extractions for determining metal speciation in sewage sludge-amended soils. *Environmental Pollution*, 144:475-482.
- Kim I.S., Kang H.K., Johnson-Green P. & LEE E.J., 2003. Investigation of heavy metal accumulation in *Polygonum thunbergii* for phytoextraction. *Environmental Pollution*, 126: 235-243.
- Kistemann T., Rind E., Rechenburg A., Koch C. Claßen T., Herbst S., Wienand I. & Exner M., 2008. A comparison of efficiencies of microbiological pollution removal in six sewage treatment plants with different treatment systems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211: 534-545.
- Korboulewsky N., Masson G., Bonin G., Massiani C. & Prone A., 2001. Effets d'un apport de compost de boues de station d'épuration dans un sol d'un vignoble du Sud de la France. *Étude et Gestion des Sols*, 8: 203-210.
- Kozłowski T.T., 1984. Responses of woody plants to flooding, p. 129-163. *In*: T.T. Kozłowski (ed.). *Flooding and plant growth*. Academic, New York.
- Kozłowski T.T., 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. *In* *Tree physiology monograph*. pp. 1-29. Victoria, Canada: Heron.
- Kurihara Y. & Kadowaki K.-I., 1988. Effect of different ecological conditions on the mud snail (*Cipangopaludina japonica*) in submerged paddy soil. *Biology and Fertility of Soils* 6: 292-297.
- Kuster M., López de Alda M.J. & Barceló D., 2005. Estrogens and Progestogens in Wastewater, Sludge, Sediments, and Soil. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 5: 1-24.
- Labercque M., Teodorescu T.I. & Daigle S., 1995. Effect of wastewater sludge on growth and heavy metal bioaccumulation of two *Salix* species. *Plant and soil*, 171: 303-316.
- Laclau J.P., 2001. Dynamique du fonctionnement minéral d'une plantation d'eucalyptus : Effets du reboisement sur un sol de savane du littoral congolais ; conséquences pour la gestion des plantations industrielles. Thèse: INA P-G.
- Lakhdar A., Scelza R., Scotti R., A. Rao M., Jedidi N., Gianfreda L. & Abdelly C., 2010. The effect of compost and sewage sludge on soil biologic activities in salt affected soil. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, 10: 40-47.
- Laskowski R. & Hopkin S.P., 1996a. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): implications for predators. *Environmental Pollution*, 91:289-297.
- Laskowski R. & Hopkin S.P., 1996b. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34:59-69.

- Le Gouguec P., 1997. Epandage des boues de stations d'épuration en forêt. In : Epandage des boues résiduelles ; aspects sanitaires et environnementaux. Journées techniques ADEME, 5-6/06/1997, pp. 143-144.
- Le Tacon F., Bouchard D. & Garbaje J., 1988. Augmentation de la croissance initiale du Frêne (*Fraxinus excelsior* L.) par l'épandage de boues de station d'épuration urbaine et plantation intercalaire d'Aulne blanc (*Alnus Incana* L.Moench). Revue Forestière Française, vol. XL, n°2, pp. 117-125.
- Lebourg A., Sterckeman T., Ciesielski H. & Proix N., 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. Agronomie, 16: 201-215.
- Lee K.W. & Keeney D.R., 1975. Cadmium and zinc additions to Wisconsin soils by commercial fertilizers and wastewater sludge application. Water, Air & Soil Pollution, 5: 109-112.
- Legret M., Divet L. & Juste C., 1988. Movement and speciation of heavy metals in a soil amended with sewage sludge containing large amount of Cd and Ni. Water Research, 22: 953-959.
- Legroux J.P. & Truchot C., Octobre 2009. Bilan de dix années d'application de la réglementation relative à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Rapport n°771 CGAAER du ministère de l'écologie, du développement et de l'aménagement durables (direction de l'eau) et du ministère de l'agriculture et de la pêche (direction générale de la forêt et des affaires rurales).
- Leitgib L., Kalman J. & Gruiz K., 2007. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. Chemosphere, 66: 428-434.
- Lindsay W.L., Vlek P.L.G. & Chien S.H., 1989. Phosphate minerals. In: Minerals in soil environment, 2nd edition. Edited by Dixon J.B. & Weed S.B. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp.1089-1130.
- Liu H., David W., Ye Y., Cui B., Huang Y.H., Colón-Carmona A. & Wang Z.H., 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science, 176: 375-382.
- Loué A., 1993. Oligoéléments en agriculture. Editions Nathan, 577 p.
- Mahdavi M. & Jafari J., 2010. Environmental Risks due to Application of Sewage Sludge in Farmlands. Ocean Journal of Applied Sciences, 3.
- Majid N.M., Islam M.M. & Mathew L., 2012. Heavy metal uptake and translocation by mangium (*Acacia mangium*) from sewage sludge contaminated soil. Australian Journal of Crop Science, 6: 1228-1235.

- Makris K.C., Harris W.G., O'Connor G.A. & El-Shall H., 2005. Long-term phosphorus effects on evolving physicochemical properties of iron and aluminum hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 287: 552-560.
- Malagoli M., Dal Canal A., Quaggiotti S., Pegoraro P. & Bottacin A., 2000. Differences in nitrate and ammonium uptake between Scots pine and European larch. *Plant and Soil*, 221: 1-3.
- Mantovi P., Baldoni G., DalRe L., Piccinini S. & Rossi L., 2006. Effects of 15 years sludge application on cropland. In: *Sludge disposal; Proceeding book of IWA conference of Sludge management, Moscow, Sec. 10: 10-16.*
- Margolis H.A., Vézina L.P. & Ouimet R., 1988. Relation of light and nitrogen source to growth, nitrate reductase and glutamine synthetase activity in Jack pine seedlings. *Physiologia Plantarum*, 72: 790-795.
- Marigomez I., Soto M., Cajaraville M.P., Angulo E. & Giamberini L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, 56: 358-392.
- Marschner, H., 1995. *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd Edition. Academic Press, San Diego.
- Martin M.H. & Coughtrey P.J., 1982. *Biological monitoring of heavy metal pollution.* Applied Science Publishers, London p. 475.
- Martinez C.E. & Motto H.L., 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, 107: 153-158.
- Martinez F., Cuevas C., Walter T. & Iglesias I., 2002. Urban organic wastes effects on soil chemical properties in degraded semiarid ecosystem. *In: Seventeenth WCSS, Symposium No. 20, Thailand.* pp. 1-9.
- Mata-Gonzalez R., Sosebee R.E. & Wan C., 2002. Physiological impacts of biosolids application in desert grasses. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 139-148.
- Mathieu C. & Pielain F., 2003. *Analyse chimique des sols : Méthodes choisies.* Lavoisier 386p.
- McBride M.B., 2002. Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? *Advances in Environmental Research*, 8: 5-19.
- McGrath S.P. & Cunliffe C.H., 1985. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36: 794-798.
- McLaughlin M.J., Zarcinas B.A., Stevens D.P. & Cook N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31: 11-14.

- Meador J.P., Stein J.E., Reichert W.L. & Varanasi U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, 143: 79-165.
- Mechri B., Echbili A., Issaoui M., Braham M., Ben Elhadj S. & Hammamia M., 1997. Short-term effects in soil microbial community following agronomic application of olive mill wastewaters in a field of olive trees. *Applied Soil Ecology*, 36: 216-223.
- Miah M.Y., Chiu C.Y., Hayashi H. & Chino M., 1999. Barley growth in response to potassium fertilization of soil with long-term application of sewage sludge. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45: 499-504.
- Mitchell D. S., Edwards A.C. & Ferrier R.C., 2000. Changes in fluxes of N and P in water draining a stand of Scots pine treated with sewage sludge. *Forest Ecology and Management*, 139: 203-213.
- Moffett B.F., Nicholson F.A., Uwakwe N.C., Chambers B.J., Harris J.A. & Hill T.C.J., 2003. Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 13-19.
- Mohanty B. & Fletcher J.S., 1976. Ammonium Influence on the Growth and Nitrate Reductase Activity of Paul's Scarlet Rose Suspension Cultures. *Plant Physiology*, 58: 152-155.
- Morel C., Cachot C., Martinez J., Peu P., Elsass F., Robert M. & Fardeau J.-C., 2004. Evolution sur 12 ans de la solubilité, mobilité et lixiviation du phosphate dans un sol ayant massivement reçu du lisier. *Étude et Gestion des Sols*, 11: 403-418.
- Morel C., Linères M., Guivarch A., Kvarnströmb E., Parnaudeau V., Nicolardot B. & Morel J.-L., 2003. Phytodisponibilité et valeur fertilisante du phosphore de déchets urbains. *Agriculture et épandage de déchets urbains et agro-industriels. Les dossiers de l'environnement de l'INRA n°25*. (Paris), 154 p.
- Mosquera-Losada M.R., Lopez-Diaz L. & Rigueiro-Rodriguez A., 2001. Sewage sludge fertilisation of a silvopastoral system with pines in northwestern Spain. *Agroforestry System*, 53: 1-10.
- Mougin C., Igel-Egalon A., Cheviron N., Marraud C. Repiçay C. Hedde M. & Hernandez-Raquet G., 2011. Quel impact à long terme des antibiotiques apportés au sol lors de l'épandage de lisiers? L'exemple de la ciprofloxacine. *Comm. Orale-SEFA (société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée). Muséum national d'histoire naturelle*.
- Muchuweti M., Birkett J.W., Chinyanga E., Zvauya R., Scrimshaw M.D. & Lester J.N., 2006. Heavy metal content of vegetables irrigated with mixtures of wastewater and sewage sludge in Zimbabwe: Implications for human health. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 112: 41-48.

- Munir J.M. & Bayan M.A., 2004. Changes in soil fertility and plant uptake of nutrients and heavy metals in response to sewage sludge application to calcareous soils. *Journal of Agronomy*, 3: 229-236.
- Myre R. & Camiré C., 1994. Distribution de P, K, Ca, Mg, Mn et Zn dans la tige des mélèzes européen et laricin. *Annals of Forest Science*, 51: 121-134.
- N'Dayegamiye A., Drapeau A., Huard S. & Thibault Y., 2004. Intégration de boues mixtes et de fumiers dans des rotations agricoles : réponse des cultures et interactions avec les propriétés du sol. *Agrosol*, 15: 83-90.
- Nèble S., Calvert V., Le Petit J. & Criquet S., 2007. Dynamics of phosphatase activities in a cork oak litter (*Quercus suber* L.) following sewage sludge application. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2735-2742.
- Nicodemus M.A., Salifu K.F. & Jacobs D.F., 2008. Nitrate reductase activity and nitrogen compounds in xylem exudate of *Juglans nigra* seedlings: relation to nitrogen source and supply. *Trees*, 22: 685-695.
- Nicolardot B., Parnaudeau V., Générmont S., Morvanc T., Hénault C., Flura D., Roberte P., Marcovecchio F. & Linères M., Morel C., 2003. Disponibilité en azote des effluents urbains, agro-industriels et issus d'élevage. Les dossiers de l'environnement de l'INRA n°25. (Paris), 154 p.
- Notten M.J.M., Oosthoek A.J.P., Rozema J. & Aerts R., 2006. The landsnail *Cepaea nemoralis* regulates internal Cd levels when fed on Cd-enriched stinging nettle (*Urtica dioica*) leaves at low, field-relevant concentrations. *Environmental Pollution*. 139: 296-305.
- Notten M.J.M., Walraven N., Beets C.J., Vroon P., Rozema J. & Aerts R., 2008. Investigating the origin of Pb pollution in a terrestrial soil-plant-snail food chain by means of Pb isotope ratios. *Applied geochemistry*, 23: 1581-1593.
- Oberley L.-W. & Spitz D.-R., 1985. Nitroblue tétrazolium. *Handbook of methods for oxygen radical research*, pp. 217-220.
- Ona L.F., Alberto A.P., Prudente J.A. & Sigua G.C., 2006. Levels of lead in urban soils from selected cities in the rice-based region of the Philippines. *Environmental Science and Pollution Research*, 13: 177-183.
- ORDIF (Observatoire régional des déchets d'Île de France), 2003. L'actualité des boues de stations d'épuration en Ile de France, compte rendu de la journée technique d'information et d'échanges, Jeudi 9 octobre 2003.
- Orebanjo T.O. & Stewart G.R., 1975. Ammonium Inactivation of Nitrate Reductase in *Lemna minor* L. *Planta*, 122: 37-44.

- Painchaud J., 1997. La qualité de l'eau des rivières du Québec : état et tendances. Direction des écosystèmes aquatiques. Ministère de l'Environnement et de la Faune. 83p.
- Panda S. K. & Choudhury S., 2005. Change in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 191-197.
- Parkpain P., Sreesai S. & Delaune R.D., 2000. Bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended Thai soils. *Water, Air & Soil Pollution*, 122: 163-182.
- Penn C.J. & Sims J.T., 2002. Phosphorus forms in biosolids-amended soils and losses in runoff: effects of wastewater treatment process. *Journal of Environmental Quality*, 31: 926-936.
- Pérez Garcia V., Iglesias Jiménez E. & Fernandez Falcon M., 1986. The Agronomic Value of the Sewage Sludge of Tenerife: Physico-Chemical Characteristics of the Refuse-Sludge Compost and Related Products. *Agricultural Wastes*, 17: 141-152.
- Pérez-Novo C., Bermúdez-Couso A., López-Periago E., Fernández-Calviño D. & Arias-Estévez M., 2011. Zinc adsorption in acid soils: Influence of phosphate. *Geoderma*, 162: 358-364.
- Perrin-Ganier C., Soulas G., Ciesielski H., Caria G. & Budzinski H., 2003. Disponibilité de composés traces organiques dans les sols amendés par des boues d'épuration. Les dossiers de l'environnement de l'INRA n°25. (Paris), 154 p.
- Piquery L., Davoine C., Huault C. & Billard J.P., 2000. Senescence of leaf sheaths of ryegrass stubble: Changes in enzyme activities related to H₂O₂ metabolism. *Plant Growth Regulation*, 30: 71-77.
- Planquart P., Bonin G., Prone A. & Massiani C., 1999. Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: application to low metal loadings. *Science of the Total Environment*, 241: 161-179.
- Prasad M.N.V. & Hagemeyer J., 1999. Heavy metal stress in plants. 401pages.
- Puig S., Andres-Colas N., Garcia-Molina A. & Penarrubia L., 2007. Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: response to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell and Environment*, 30: 271-290.
- Rameau J.C., Mansion D. & Dume G., 1993. Flore Forestière Française: Guide Écologique Illustré 2 : Montagnes, Institut pour le Développement Forestier-Paris, 2421 p.
- Ramos L., Hernandez L.M. & Gonzalez M.J., 1994. Sequential fractionation of copper, lead, cadmium and zinc in soils from or near Donana national park. *Journal of Environmental Quality*, 23: 50-57.

- Ranger J., Colin-Belgrand M. & Nys C., 1995. Le cycle biogéochimique des éléments majeurs dans les écosystèmes forestiers : importance dans le fonctionnement des sols. *Etude et Gestion des Sols*, 2: 119-134.
- Reddy G.B., Faza A. & Bennett R., 1987. Activity of enzymes in rhizosphere and non-rhizosphere soils amended with sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 203-205.
- Reed B.E., Carriere P.E. & Matsumoto M.R., 1991. Applying sludge on agricultural land. *Biocycle*, 32: 58-60.
- Rentsch D, Schmidt S & Tegeder M., 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters*, 581: 2281-2289.
- Richards B.K., Steenhuis T.S., Peverly J.H. & McBride M.B., 2000. Effect of sludge-processing mode, soil texture and soil pH on metal mobility in undisturbed soil columns under accelerated loading. *Environmental Pollution*, 109: 327-346.
- Riou-Nivert P., 2001. Le mélèze. Institut pour le développement forestier. Paris. 144p.
- Robakowski P., Wyka T., Samardakiewicz S. & Kierzkowski D., 2004. Growth, photosynthesis, and needle structure of Silver fir (*Abies alba* Mill.) seedlings under different canopies. *Forest Ecology and Management*, 201:211-227.
- Robert M., 1996. Le sol interface dans l'environnement, ressource pour le développement. Ed. Masson, Paris. 244p.
- Romdhanaa M.H., Lecomte D., Ladeviea B. & Sablayrolles C., 2009. Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, 87: 377-386.
- Rowell D.M., Prescott C.E. & Preston C.M., 2001. Decomposition and nitrogen mineralization from biosolids and other organic materials: relationship with initial chemistry. *Journal of Environmental Quality*, 30: 1401-1410.
- Roy M. & Couillard D., 1997. Use of municipal sewage sludge for the fertilization of forests. Mobility of metals and the risk of surface- and ground-water contamination. *Revue des sciences de l'eau*, 4: 507-525.
- Roy M. & Couillard D., 1998. Metal leaching following sludge application to a deciduous forest soil. *Water Research*, 32: 1642-1652.
- Ruby M.V., Schoof R., Brattin W., Goldade M., Post G., Harnois M., Mosby D.E., Casteel S.W., Berti W., Carpenter M., Edwards D., Cragin D. & Chappell W., 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science and Technology*, 32: 3697-3705.
- Sabey B. R. & Hart W. E., 1975. Land application of sewage sludge: Effect on growth and chemical composition of plants. *Journal of Environmental Quality*, 4: 252-256.

- Sanità di Toppi L. & Gabbrielli R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41: 105-130.
- Sanyal S.K. & De Datta S.K., 1991. Chemistry of phosphorus transformations in soils. *Advances in soil science*, 16: 1-120.
- Saruhan V., Gul I. & Aydin I., 2010. The effects of sewage sludge used as fertilizer on agronomic and chemical features of bird's foot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and soil pollution. *Scientific Research and Essays*, 5: 2567-2573
- Sauvé S., McBride M.B., Norvell W.A. & Hendershot W.H., 1997. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter. *Water, Air & Soil Pollution*, 100: 133-149.
- Sbih M., 1999. Dynamique de la matière organique dans quelques sols sous prairies de la région de Québec. Thèse: Université Laval. 150 p.
- Scheifler R., BenBrahim M., Gomot-de Vaufleury A., Carnus J.-M. & Badot P.M., 2003. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environmental Pollution*, 122: 343-350.
- Seith B., Setzer B., Flaig H. & Mohr H., 1994. Appearance of nitrate reductase and glutamine synthetase in different organs of the Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings as affected by light, nitrate and ammonium. *Physiologia Plantarum*. 91: 419-426.
- Seregin I.V., Shpigun L.K. & Ivanov V.B., 2004. Distribution and toxic effects of Cadmium and Lead on maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51: 525-533.
- Shah K., Ritambhara G.K., Verma S. & Dubey R.S., 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161: 1135-1144.
- Sharma P. & Dubey R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 35-52.
- Shepherd M.A., 1996. Factors affecting nitrate leaching from sewage sludges applied to a sandy soil in arable agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 58:171-185.
- Siedlecka A. & Krupa Z., 2002. Functions of enzymes in heavy metal treated plants. *In: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 303-324.
- Sikora L.J. & Enkir N.K., 1999. Growth of tall fescue in compost/fertilizer blends. *Soil Sci.*, 164: 62-69.
- Simard R.R., Baziramakenga R., Yelle S. & Coulombe J., 1998. Effects of de-inking paper sludges on soil properties and crop yields. *Canadian Journal of Soil Science*, 78: 689-697.

- Sinaj S., Traoré O. & Frossard E., 2002. Effect of compost and soil properties on the availability of compost phosphate for white clover (*Trifolium repens* L.). *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 62: 89-102.
- Singh R.P. & Agrawal M., 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, 28: 347-358
- Singh R.P. & Agrawal M., 2010. Variations in heavy metal accumulation, growth and yield of rice plants grown at different sewage sludge amendment rates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 632-641.
- Smith M.T.E., Cade-Menun B.J. & Tibbett M., 2006. Soil phosphorus dynamics and phytoavailability from sewage sludge at different stages in a treatment stream. *Biology and Fertility of Soils*, 42: 186-197.
- Smith S.R. & Powlesland C.B., 1990. Impact of nitrate sensitive areas on agricultural utilisation of sewage sludge. Research report, FR0146, Foundation for Water Research, 58 p.
- Smith S.R., 1992. Sewage sludge and refuse composts as peat alternatives for conditioning impoverished soils: effects on the growth response and mineral status of *Petunia grandiflora*. *Journal of Horticultural Sciences*, 67: 703-716.
- Soltner D., 1992. Les bases de la production végétale. Tome 1 : le sol. Collection Sciences et Techniques Agricoles, 19^{ème} édition, Sainte Gemmes sur Loire.
- Sommers L.E., 1977. Chemical composition of sewage sludge and analysis of their potential use as fertilisers. *Journal of Environmental Quality*, 6: 225-232.
- Song H., Wang Y.S., Sun C.C., Wu M.L., Peng Y.L., Deng C. & Li Q.P., 2011. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on antioxidant system activities and proline content in *Kandelia candel*. *Oceanological and hydrobiological studies*, 40: 9-18.
- Speir T.W., Van Schaik A.P., Lloyd-Jones A.R. & Kettles H.A., 2003. Temporal response of soil after cultivation following high application rates of undigested sewage sludge. *Biology and fertility of soils*, 38: 377-385.
- Stamatiadis S., Doran J.W. & Kettler T., 1999. Field and laboratory evaluation of soil quality changes resulting from injection of liquid sewage sludge. *Applied Soil Ecology*, 12: 263-272.
- Stumpe B. & Marschner B., 2007. Long-term sewage sludge application and wastewater irrigation on the mineralization and sorption of 17 β -estradiol and testosterone in soils. *Science of the Total Environment*, 374: 282-291.
- Tercé M. (dir.), 2003. Agriculture et épandage de déchets urbains et agro-industriels. Les dossiers de l'environnement de l'INRA n°25. (Paris), 154 p.

- Tham C. H. & Gary M. R., 2009. Exposure routes of copper: Short term effects on survival, weight, and uptake in Florida apple snails (*Pomacea paludosa*). *Chemosphere*, 76: 407-414.
- Thomas A.-L., Carnus J.-M., Denaix L., Gautry J.-Y., Bailly A. & Thiberville F., 2004. Le réseau « ERESFOR » : Epanchage de Produits Résiduaux sur Parcelles Forestières. Dispositifs expérimentaux Et outils d'acquisition de références agro-environnementales : Retour au sol des matières organiques - 27&28 avril 2004-Paris.
- Toribio M. & Romanya J., 2006. Leaching of heavy metals (Cu, Ni and Zn) and organic matter after sewage sludge application to Mediterranean forest soils. *Science of the Total Environment*, 363: 11-21.
- Tracey G.A. & Hansen D.J., 1996. Use of biota-sediment accumulation factors to assess similarity of nonionic organic chemical exposure to benthically-coupled organisms of differing trophic mode. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30: 467-475.
- Tremel-Schaub A. & Feix I., 2005. Contamination des sols. EDP Sciences & ADEME Edition, 413 p.
- Tsadilas C.D., Matsi T., Barbayiannis N. & Dimoyiannis D., 1995. Influence of sewage sludge application on soil properties and on the distribution and availability of heavy metal fractions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 26: 2603-2619.
- Tsakou A., Roulia M. & Christodoulakis N.S., 2003. Growth parameters and heavy metal accumulation in Poplar tree cultures (*Populus euramericana*) utilising water and sludge from a sewage treatment plant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71: 330-337.
- Tung G. & Temple P.J., 1996. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *The Science of the Total Environment*, 188: 71-85.
- Usman R. A., Kuzyakov Y. & Stahr K., 2004. Dynamics of organic C mineralization and the mobile fraction of heavy metals in a calcareous soil incubated with organic wastes. *Water, Air & Soil Pollution*, 158: 401-418.
- Vaitkutė D., Baltrėnaitė E., Booth C.A. & Fullen M.A., 2010. Does sewage sludge amendment to soil enhance the development of Silver birch and Scots pine? *Hungarian Geographical Bulletin*, 59: 393-410.
- Van Straalen N.M., Butovsky R.O., Pokarzhevskii A.D., Zaitsev A.S. & Verhoef, S.C., 2001. Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia). *Pedobiologia*, 45: 451-466.

- Veeresh H., Tripathy S., Chaudhuri D., Ghosh B.C., Hart B.R. & Powell M.A., 2003. Changes in physical and chemical properties of three soil types in India as a result of amendment with fly ash and sewage sludge. *Environmental Geology*, 43: 513-520.
- Verkleij J.A.C. & Schat H., 1990. Mechanisms of metal tolerance in plants. Heavy metals tolerance in plants-evolutionary aspects. CRC press, pp.179-193.
- Vetterlein D., Bergmann C. & Hüttl R.F., 1999. Phosphorus availability in different types of open-cast mine spoil and the potential impact of organic matter application. *Plant and Soil*, 213: 189-194.
- Viaux P., 1980. Conservation des échantillons de sol en vue d'un dosage de l'azote mineral. *Science du sol*, 1: 73-88.
- Vindimian E., Robaut C. & Fillion G., 1983. A method for co-operative and non co-operative binding studies using non-linear regression analysis on a microcomputer. *Journal of Applied Biochemistry*, 5: 261-268.
- Walsh D., 1993. Gauchissement de la tige et croissance de semis de conifère traités à l'éthylène et soumis à l'anaérobiose racinaire. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi. 153p.
- Warman P.R. & Termeer W.C., 2005a. Evaluation of sewage sludge, septic waste and sludge compost applications to corn and forage: yields and N, P and K content of crops and soils. *Bioresource Technology*, 96: 955-961.
- Warman P.R. & Termeer W.C., 2005b. Evaluation of sewage sludge, septic waste and sludge compost applications to corn and forage: Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn and B content of crops and soils. *Bioresource Technology*, 96: 1029-1038.
- Whalen J.K., Chang C. & Olson B.O., 2001. Nitrogen and phosphorus mineralization potentials of soils receiving repeated annual cattle manure applications. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 664-341.
- Wickens L.K. & Cheeseman J.M., 1988. Application of growth analysis to physiological studies involving environmental discontinuities. *Physiologia Plantarum*, 73: 271-277.
- Wolstenholme R., Dutch J., Moffat A.J., Bayes C.D. & Taylor C.M.A., 1992. A manual of good practice for the use of sewage sludge in forestry. Forestry Commission Bulletin 107, HMSO.
- Yoon J., Cao X., Zhou Q., Ma Q.L., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*, 368: 456-464.

Référence Internet

Carnus J.-M. & Thomas-Chery A.L., 2007. Epanrages de produits résiduaaires sur parcelles boisées.

<https://www.bordeaux.inra.fr/eresfor/bibliocolloque/Manuel%20Recommand%202007.pdf> (Consulté le 15/06/2011).

Carnus J.-M., 2006. Epanrages de produits résiduaaires sur parcelles boisées.

<https://www.bordeaux.inra.fr/eresfor/page/reseau.htm> (Consulté le 15/06/2011).

Géoportail, 2012.

<http://www.geoportail.gouv.fr>

Réf. Internet 1 : Histoire des déchets parisiens : de Lutèce à la révolution industrielle.

<http://www.planete-echo.net/CollecteParis/EugenePoubelle.html> (Consulté le 06 juillet 2011).

Réf. Internet 2 : Eurostat « Demographyreport2010 »

http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KE-ET-10-001/EN/KE-ET-10-001-EN.PDF (Consulté le 14septembre 2012).

Réf. Internet 3 :

<http://www.meteorologic.net>. (Consulté le 16 mai 2012).

U.S.D.A., 2008. Conservation plant characteristics for scientific name (common name): U.S.D.A. plants.

<http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/tree/lardec/all.html> (Consulté le 22 juin 2012).

Résumé

L'épandage dans les plantations forestières pourrait constituer une voie alternative complémentaire à l'épandage agricole. Toutefois, les impacts environnementaux doivent être soigneusement étudiés. L'objectif de cette étude est d'évaluer les bénéfices et les risques éventuels suite à l'application des boues liquides sur (i) la croissance et le statut nutritionnel chez le mélèze (ii) sur les transferts de contaminants (Eléments Traces Métalliques "ETM") à la solution du sol, aux plantes (iii) ainsi que le long de la chaîne trophique. Les résultats du terrain ont montré que l'apport de boues liquides a eu un effet bénéfique sur la qualité du sol grâce à leur effet fertilisant marqué pour l'azote et pour le phosphore, mais pas pour les autres éléments minéraux. La migration des ETM dans le profil du sol n'a pas été observée et ceci pourrait s'expliquer par la séquestration de ces éléments au niveau de l'horizon supérieur riche en matière organique. Les résultats obtenus en conditions contrôlées ont montré une meilleure croissance en hauteur des plants de mélèze à partir du 7^{ème} mois après l'apport des boues. Cette réponse différée s'expliquerait par le temps nécessaire à la minéralisation de la matière organique apportée qui améliore le statut nutritionnel des jeunes semis. La double exposition des escargots (sols et laitues contaminés) a eu un effet bénéfique sur leur croissance. Ce résultat pourrait être dû à une meilleure qualité nutritive des plants de laitues cultivées sur sol amendé. Cette augmentation de biomasse influence positivement les quantités d'ETM accumulés dans le corps mou des escargots sans aucun effet toxique décelable.

Mots clés : boues résiduelles, plantations forestières, *Larix decidua*, nutrition minérale, éléments traces métalliques, lessivage, écotoxicité, chaîne trophique.

Abstract

Spreading sewage sludge on forest plantations may become a complementary alternative way to farmlands application. However, the environmental impacts must be carefully studied. The objective of this study was to evaluate the benefits and risks following liquid sludge application at: (i) growth and nutritional status of larch (ii) contaminants (Trace metals "TMs") transfer to soil solution, plants (iii) and along the food chain. The field results showed that liquid sludge application had a beneficial effect on soil quality because improved levels of nitrogen and phosphorus, but not for other mineral elements. The TMs leaching along the soil profile was not observed in this work. This result can be explained by the sequestration of these elements in the upper layer of soil rich in organic matter. The results obtained under controlled conditions showed a better growth in height of larch seedlings from the seventh month after sludge supply. This delayed response could be explained by the time required for mineralization of provided organic matter that improved the nutritional status of young seedlings. Snail exposure both to contaminated lettuce and amended soil had a beneficial effect on their growth parameters. This result could be due to a high nutritional quality of lettuce plants grown on amended soil. This growth stimulation induced an increase in the levels ETM snail soft body without any detectable toxic effect.

Key Words: Sewage sludge, forest plantations, *Larix decidua*, mineral nutrition, trace metals, leaching, ecotoxicity, trophic chain.