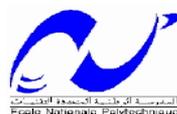


ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



**Département de Génie de l'Environnement  
Laboratoire des Biotechnologies Environnementales  
& Génie des Procédés**



# Mémoire de Magister

## Thème

Traitement d'un sol contaminé par le gasoil à l'aide d'un  
Procédé Biologique «Biopile»

Etudié par : M<sup>me</sup> Chemlal Radia

Proposé & Dirigé par:  
Dr. D. BELHOCINE

Président du jury

N. MAMERI

Professeur ENP

Examineurs

M. M. BELLAL

Professeur INA

Y. BADJA

Professeur USTHB

R. KERBACHI

Professeur ENP

Invité

H. Lounici

Maître de conférence UMMTO

Année Universitaire 2004-2005

## ملخص

يكن خطر تلوث التربة بالمواد المشتقة من البترول في تعرض المياه الباطنية للتلوث مما يؤدي إلى تزدى نوعية المياه الصالحة للشرب. و من اجل هذا فان عملية نزع التلوث من الأتربة ضروري مما يتطلب استعمال تقنيات فيزيوكيميائية و بيولوجية. تعتبر هذه الدراسة محاولة إصلاح الأتربة الملوثة بالمازوت باستعمال التقنية البيولوجية (بيوبيل) و دراسة عن قرب سبل الأيض الجرثومي المصاحب لهذا الإصلاح. تمت محاولة إصلاح الأتربة الملوثة بتقنية بيوبيل بنجاح إذ أننا تمكنا من نزع 70 بالمائة من التلوث على مستوى المخبر و 85 بالمائة على مستوى شبه القيادي.

### كلمات مفتاحية/

تلوث التربة / الأيض الجرثومي / نزع التلوث / بيوبيل / إصلاح التربة

## Résumé :

Le problème majeur rencontré dans les sols pollués par les produits pétroliers est l'atteinte des nappes phréatiques affectant ainsi la qualité des eaux. La décontamination des sols pollués nécessite l'intervention des procédés physicochimiques et biologiques.

Le but de notre étude consiste à restaurer un sol contaminé par du gasoil par un procédé biologique et d'étudier de près le métabolisme microbien qui s'accompagne avec la biodégradation des hydrocarbures.

Nous avons pu restaurer un sol pollué par le gasoil à l'aide de la technique biopile.

En effet, au bout de 90 jours nous avons obtenu une décontamination de 70% à l'échelle laboratoire et 85% à l'échelle semi-pilote.

**Les mots clés :** Biorestoration, biorémediation, biopile et biodégradation des hydrocarbures.

## Abstract

The major problem encountered in the soils polluted by the petroleum products is the contamination of aquiferous thus affecting the quality of water. The decontamination of the polluted soils requires the intervention of the physico-chemical and biological processes.

Our study consists in restoring a soil contaminated by gas oil using biological process and to study the microbial metabolism, which is accompanied with the biodegradation of hydrocarbons.

We could restore a soils polluted by the gas oil using the technique biopile.

Indeed, at the end of 90 days we obtained a decontamination of 70% on the laboratory and 85% on the semi-pilot.

**Key words:** Biorestoration, bioremediation, biopile and biodégradation of hydrocarbons.

## *Dédicace*

*Louange à Dieu*

*A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.*

*A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses filles.*

*A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A ma chère sœur Loubna.*

*A mon époux.*

*A ma très chère fille Lyna.*

*A la mémoire de mes grands parents.*

*A ma grand mère paternelle.*

*A mes beaux parents.*

*A Rosa & Amina.*

*A mes cousins Mahieddine et Nadjib.*

*Radia*

## Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de BioGep de l'Ecole Nationale Polytechnique sous la direction de M<sup>r</sup> N. Mameri, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechniques.

La concrétisation de ce travail a été rendue possible par la participation d'un grand nombre de personnes. Qu'elles veuillent bien trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Mes sincères remerciements et ma respectueuse reconnaissance vont à M<sup>r</sup> N. Mameri, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechniques qui m'a si aimablement accueilli dans son laboratoire.

J'exprime ma profonde reconnaissance à M<sup>me</sup> D. Belhoucine, Maître de conférences à l'école nationale polytechnique qui en dirigeant ce travail m'a fait profiter de l'étendue de ses connaissances et de son expérience dans le domaine.

Mes vifs remerciements vont également à M<sup>r</sup> H. Lounici, Maître de conférences à l'université de Mouloud Mammeri pour son aide et pour avoir accepté d'assurer la tâche des corrections. Son dynamisme et son enthousiasme sont pour nous un exemple.

Qu'il me soit permis de remercier une seconde fois M<sup>r</sup> N. Mameri, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechniques qui a daigné accepter de présider le jury.

Je remercie également M<sup>r</sup> M. M. Bellal, Directeur et professeur à l'Institut National d'Agronomie ; M<sup>r</sup> R. Kerbachi, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechniques et M<sup>r</sup> Y. Badja, Professeur à l'USTHB qui ont bien voulu m'accorder une partie de leur temps pour examiner ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à M<sup>elle</sup> Tassist Amina, Maître Assistante à l'Université de Médéa pour son aide sans limite, ses idées précieuses et ses qualités humaines.

J'exprime toute ma reconnaissance à mes parents en particulier ma mère, ma sœur loubna et mon époux M. Alloune pour leurs soutiens sans faille.

Je n'aurai garde d'oublier dans mes remerciements :

- M<sup>r</sup> L. Guezlane, Directeur de l'Ecole National Vétérinaire.
- M<sup>r</sup> K. Brouri, Directeur de la planification à Sonatrach- Activité Amont.
- M<sup>me</sup> N. Boutemeur, Directeur HSE/Amont à Sonatrach.

- M<sup>r</sup> Labadi Redouane, Technicien au laboratoire de pédologie à l'INA pour son aide technique et sa disponibilité.
- M<sup>r</sup> Hafid, Responsable du laboratoire Infrarouge au CRD et M<sup>me</sup> F. Tibaoui, Ingénieur au laboratoire Infrarouge du CRD pour les analyses par infrarouge.
- M<sup>r</sup> M. H. Ouled Feroukh, Responsable au laboratoire de pédologie à l'INRA, sans oublier le personnel du laboratoire de pédologie à l'INRA.
- Le personnel à l'URBAL, en particulier M<sup>me</sup> Hakem et M<sup>me</sup> H. Belhocine.
- M<sup>elles</sup> A.Chikh, T. Abassene et en particulier M<sup>elle</sup> Skander du CRD pour les analyses en CPG.
- Tous mes camarades du département Génie de l'environnement en particulier Hamida et Rachida, sans oublier Hamida la secrétaire.
- Le personnel de la bibliothèque à l'ENP et à l'INA en particulier M<sup>elle</sup> F. Laribi.

Il me serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

## Introduction

---

Au cours de ce siècle, l'industrie pétrolière a connu une importance accrue grâce au rôle stratégique et politique que le pétrole joue dans la scène mondiale. En effet, pour l'année 2000, la production mondiale est atteinte à 11 millions de tonnes par jours de produits pétroliers (Soltani, 2004). Ces derniers sont considérés comme la matière première pour l'industrie chimique et la source d'énergie la plus demandée et la moins coûteuse.

Mais depuis quelques années, on commence à évaluer les effets dévastateurs de cette industrialisation sur l'environnement, des dégâts réels ont été constatés lors des accidents (déversement, fuite...etc.) et des rejets entraînant des fois des catastrophes écologiques irréversibles.

En général, la pollution pétrolière est étroitement liée aux différentes étapes de leur industrie, de l'exploration du pétrole jusqu'à sa commercialisation (forage, raffinage, transport, stockage et distribution).

L'impact de cette pollution réside dans les effets suivants:

- Une menace pour la santé humaine;
- Déséquilibre de l'écosystème (des pertes au niveau de la faune et la flore);
- Altération de la qualité des sols.

Le problème majeur rencontré dans les sols pollués par les produits pétroliers est l'atteinte des nappes phréatiques affectant ainsi la qualité des eaux. La décontamination des sols pollués nécessite l'intervention des procédés physicochimiques et biologiques pour éliminer la pollution.

En dépit de l'utilisation multiple des procédés physicochimiques dans la restauration des sols pollués par les produits pétroliers, la biorémediation reste la solution la plus efficace, la plus demandée, la mieux maîtrisée et la moins coûteuse. Il s'agit en effet d'une technique douce dont le principe repose sur la minéralisation complète des produits pétroliers et ne génère aucun sous

produit toxique, contrairement aux procédés physicochimiques qui consistent souvent en un transfert de la pollution d'un milieu à un autre ou encore à son confinement.

La réussite de la biorémediation dépend de trois facteurs essentiels :

- Les propriétés physicochimiques du sol;
- La capacité des microorganismes autochtones de dégrader les hydrocarbures;
- La nature et la quantité des hydrocarbures.

En 2003, l'Algérie a produit plus 212 millions de tonnes de produits pétroliers, 41 puits ont été forés et la longueur totale du réseau de canalisation est passé à 15000Km en 2003. Le volume d'hydrocarbures transporté par canalisations s'est élevé à 219 millions de tonnes de produits pétroliers, les quantités transportées et livrées au Nord à partir des gisements du Sud s'élèvent à 160 millions de tonnes de produits pétroliers (Sonatrach, 2003), ces chiffres révèlent que l'Algérie possède un réseau de canalisation important et cela peut engendrer dans certaines situation à une pollution des sols suite à une défaillance, c'est le cas de la pollution à Constantine, Skikda et Arzew. En revanche, les structures de décontamination en Algérie sont totalement absentes.

Notre travail rentre dans le cadre de la bioréhabilitation d'un sol pollué par du gazoil à l'aide d'une biopile et dont les principaux objectifs sont les suivants:

- Elimination du gazoil dans le sol contaminé ;
- Evaluer l'efficacité du traitement;
- Etudier le mécanisme microbien.

L'étude a porté sur :

- La caractérisation physicochimique et microbiologique du sol ;
- Le comportement microbien au cours du traitement ;
- Quantification des hydrocarbures totaux ;
- Etude qualitative des hydrocarbures.

Ce document est structuré en six chapitres. Une revue bibliographique concernant les généralités sur le sol, l'origine des hydrocarbures dans l'environnement, les voies métaboliques de la biodégradation des hydrocarbures et la restauration des sols pollués fait l'objet des chapitres I à

IV respectivement.

L'ensemble du matériel et des méthodes utilisés pour la cette étude est présenté dans le cinquième chapitre. Le sixième chapitre est consacré au résultats et discussions.

Nous terminerons, enfin, par une conclusion générale.

## Généralités sur le sol

I.1 DEFINITION : On peut définir le sol comme étant une infime pellicule à la surface de la croûte terrestre, formée au cours des temps géologiques par une lente transformation des roches mères initiales sous l'effet de phénomènes physiques, chimiques et biologiques, dont l'action se poursuit de nos jours (Davet, 1996).

I.2 COMPOSITION DU SOL : Le sol est un milieu minéral poreux : gaz et liquides peuvent y circuler, mais c'est aussi un support de vie créatrice de matière organique dans laquelle nous séparerons la matière organique vivante (métaboliquement active) de la matière organique morte (Davet, 1996).

Ceci nous amène à distinguer quatre phases différentes qui constituent le sol :

- Une phase solide
- Une phase liquide
- Une phase gazeuse
- Une phase organique

Ils sont dans un état de division assez fine et intimement entremêlés qu'il est difficile de les séparer les uns des autres d'une manière satisfaisante (Buckman et Brady, 1965).

### I.2.1 La phase solide :

Elle représente 93 à 95 % du poids total du sol, elle est composée d'éléments de taille très diverse provenant de la fragmentation de la roche mère. On les classe en fonction de leur volume en cailloux, graviers, sables grossiers, sable fin et limons (voir Tableau N° I.1).

L'altération et la transformation de ces éléments minéraux de base en particules de taille plus fine que les limons ( $< 2\mu\text{m}$ ), donnent naissance à une autre catégorie de particules : ce sont les argiles (Davet, 1996).

Les minéraux dans le sol sont groupés en quatre classes :

- ❖ Minéraux primaires ;
- ❖ Minéraux secondaires (argiles) ;
- ❖ Minéraux amorphes (oxyde de fer et hydroxydes de fer);

- ❖ Carbonates et autres précipités (Comeau, 1999).

Tableau n°I.1 : Classement des particules minérales du sol en fonction de leur taille  
(Davet, 1996).

Catégorie	Diamètres extrêmes
Graviers	2 à 20 mm.
Sable grossier	0,2 à 2 mm.
Sable fin	0,02 à 0,2 mm.
Limon	0,002 à 0,02 mm.
Argile	< 0,002 mm.

### **I.2.1.A) Les argiles :**

Les argiles sont des particules colloïdales inorganiques. Ce sont des minéraux constitués par des feuillets empilés les uns sur les autres par des liaisons hydrogènes (l'illite et kaolinite).

Dans d'autres types d'argiles, la cohésion est assurée par des forces faibles. Les feuillets peuvent alors s'écarter et des molécules d'eau, contenant des substances dissoutes, peuvent pénétrer dans les espaces, l'argile gonfle, c'est le cas des smectiques.

Chaque feuillet est lui-même formé de deux ou trois couches superposées. Dans chaque couche, un ion métallique occupe le centre d'une figure géométrique à trois dimensions dont les sommets sont des ions oxygène ou hydroxyles.

Les argiles jouent un rôle important sur le plan biologique à cause de ces propriétés :

- Capacité d'échanger des ions  $H^+$  contre d'autres cations, qui lui confèrent un effet tampon.
- Capacité de retenir de grandes quantités d'eau.
- Capacité de retenir non seulement des ions minéraux, mais aussi des molécules organiques. Cette rétention a un double effet : elle empêche l'entraînement par lessivage de ces composés, et elle les met aussi temporairement à l'abri d'une dégradation par les microorganismes ou par les enzymes du sol,
- L'argile assure au sol une bonne structure facilitant ainsi la circulation de l'eau et les échanges gazeux (Davet, 1996 ; Comeau, 1999).

### I.2.2 La phase liquide :

Le sol contient une quantité variable d'eau, issue des précipitations, de l'infiltration et du ruissellement (Figure N°I.1). Cette eau est une interaction permanente avec l'atmosphère (infiltration des pluies, échanges avec les plantes, évaporation,...) et avec l'eau souterraine (nappes) (Lemière et al, 2001).

Cette eau n'est pas pure, mais contient une grande variété de substance en solution : des sels minéraux, des complexes organométalliques et des composés organiques d'origines diverses. Leurs concentrations varient selon le degré d'humidité du sol (Davet, 1996).

#### I.2.2.A) Les états de l'eau dans le sol :

On distingue deux grands types d'eau souterraine (Tableau N°I.2).

- a) L'eau gravitaire ou mobilisable : il s'agit de l'eau qui peut s'écouler librement dans le sol.
- b) L'eau de rétention ou non mobilisable : elle concerne l'eau retenue dans les vides à la surface des grains ou des parois de microfissures par des forces supérieures à celle de la gravité (les forces d'attraction moléculaires) (AFEE, 1989a).

Il s'agit :

- de l'eau adsorbée ou hygroscopique (mince pellicule d'eau de l'ordre de dixième de micron). Ce type d'eau ne peut être extrait.
- de l'eau pelliculaire (ordre de micron) animée de mouvement à la surface des grains. Ce type d'eau ne peut être extrait que par centrifugation.

En effet, l'interface eau-grain est un lieu de champ de forces d'attraction moléculaire. Celles-ci décroissent de la surface des grains (où les molécules d'eau sont adsorbées) vers le centre des vides où elles deviennent libres. Les molécules d'eau ne sont alors qu'à la gravité (AFEE, 1989a).

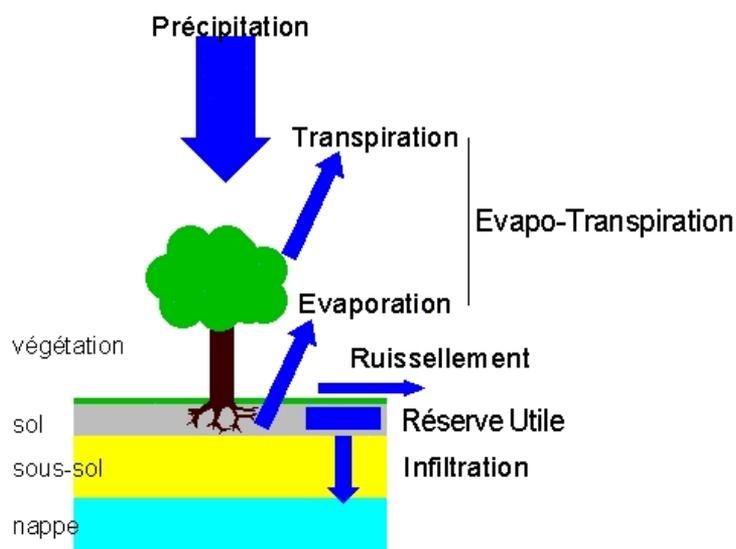


Figure I.1: place de l'eau du sol dans le cycle de l'eau (Coulomb, 1992)

Tableau n°I.2 : Types d'eau souterraine déterminée conventionnellement par les moyens et les énergies mis en œuvre pour leur extraction (Castany, 1982).

Types d'eau souterraine		Moyens d'extraction	Forces exercées
Eau disponible	Eau gravitaire	Egouttage Dessiccation à 108 °C	Gravité Chaleur
Eau non disponible	Eau de rétention	Eau pelliculaire	Attraction moléculaire
		Eau adsorbée	

**1.2.2.B) La zonalité sol-eau souterraine :**

Elle est représentée par deux zones caractéristiques :

- **La zone non saturée (ou d'aération) :** cette zone comprend l'ensemble des niveaux du sous-sol et sol situé au-dessus de la nappe. Ces niveaux sont dits « non saturés » car leur porosité ne contient pas seulement de l'eau, mais également de l'air (Lemière et al, 2001). Selon l'association AFEE (1989a), l'eau gravitaire y est en transit, sa quantité y est nulle. Cette zone comprend :
  - ❖ La zone d'évapotranspiration (interface sol/sous-sol) soumise à des variations de teneurs en eau importante provoquée par l'infiltration et l'évapotranspiration. Sa profondeur est variable ;

- ❖ La zone de transition où la teneur en eau est voisine de la capacité de rétention ;
- ❖ La zone de frange capillaire, alimentée par l'eau de la zone saturée remontant par ascension capillaire (c'est l'eau capillaire retenue).
- **La zone saturée** : elle est caractérisée par les deux types d'eau (de rétention et gravitaire) qui y sont présente, c'est le domaine de la nappe d'eau souterraine (AFEE, 1989a).

### I.2.3 La phase gazeuse :

L'air du sol diffère sous plusieurs rapports de celui de l'atmosphère :

- En premier lieu, l'air du sol n'est pas continu, étant placé dans les pores du sol, séparé par les matières solides, ceci explique les variations de composition d'un endroit à l'autre et les réactions qui se produisent avec d'autres gaz peuvent considérablement modifier la composition de l'air du sol.
- En second, l'air du sol contient généralement plus d'humidité que l'atmosphère.
- Troisièmement, la teneur en acide carbonique est généralement plus élevée et celle en oxygène plus faible que celles qu'on rencontre dans l'atmosphère (Buckman et Brady, 1965).

### I.2.4 La phase organique :

La matière organique est un autre type de matière colloïdale dans le sol. Elle se trouve à divers stades de décomposition.

La matière organique d'un sol est dérivée de :

- ❖ la matière végétale ;
- ❖ la matière animale ;
- ❖ les microorganismes (vivants et morts) ;
- ❖ des produits dérivés de l'activité des plantes ou des microorganismes ;
- ❖ des produits de décomposition des débris organiques.

De 65 à 75% de la matière organique du sol est composée de matière humique (acides humiques, acide fulvique et humus). Les fractions des matières humiques sont distinguées comme suit : les humus sont les matières non solubles à tout pH, les acides humiques ne sont solubles à pH acide (<2) et les acides fulviques sont solubles à tout pH.

Les matières humiques présentent les caractéristiques suivantes : amorphes, de couleur foncée, hydrophiles, acides partiellement aromatiques, de structure chimique très complexe, de poids moléculaire dans les centaines à des milliers, avec une très haute surface spécifique (500 à 800 m<sup>2</sup>/g) et une très forte CEC (Complexe d'Echange Cationique) (200 à 400 méq/100g).

Une aussi forte CEC empêche effectivement le lessivage des cations. Ces composés peuvent former des complexes solubles et insolubles avec les métaux. De plus, ils peuvent interagir chimiquement avec des minéraux et une variété de composés organiques, notamment par adsorption à cause de leur caractère lipophile.

L'humus offre aussi un bon potentiel de rétention d'eau, adsorbant de 2 à 6 fois son poids en eau. Le reste de la matière organique est principalement constitué de :

- Polymères insolubles à haut poids moléculaire : cellulose (15 à 60% en masse) ; hémicellulose 10 à 30% ; amidon 5 à 30% ; lignine, protéine 2 à 15%.
- Composés solubles à faible poids moléculaires (sucre, sucres aminés, aminoacides) qui sont, en masse minoritaires (<10).

Ces substances sont relativement biodégradables en comparaison avec les matières humiques.

Tous les constituants organiques subissent une évolution selon deux voies (Figure I.2), la majeure partie sera minéralisée et une faible partie transformée en composés humiques par humification, transformation physico-chimique. Plus de la moitié et parfois la totalité de la matière organique du sol est associée à l'argile avec laquelle elle forme des complexes très stables (complexe argilo-humique). Les particules d'argiles se trouvent en général enrobées par une pellicule de matière organique (Davet, 1996 ; Robert, 1996; Comeau, 1999).

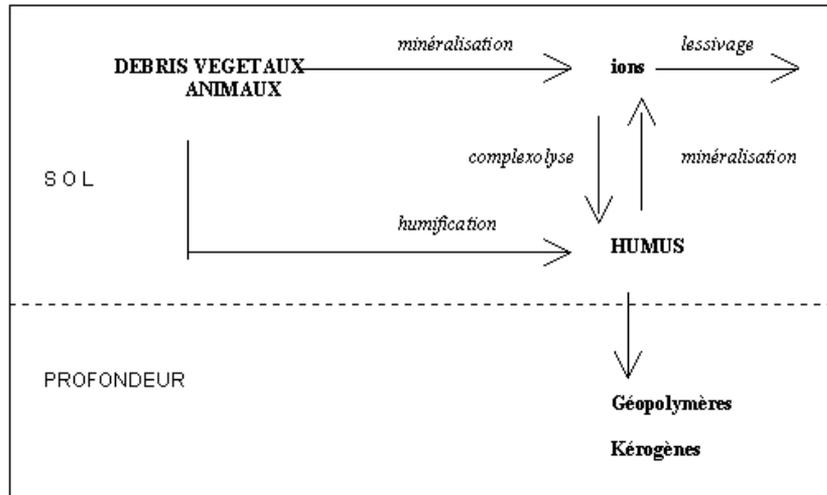


Figure I.2 : Devenir de la matière organique dans le sol (Morel, 1996)

### I.3 LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU SOL :

#### I.3.1 La texture du sol :

Elle peut être décrite qualitativement, en fonction de son aspect graveleux ou fin, ou quantitativement, à partir des proportions de particules minérales plus ou moins grossières, sans tenir compte de la matière organique présente. Les propriétés agricoles du sol dépendent largement de cette texture (Lemière et al, 2001):

- Un sol grossier et sableux sera peu compact, bien aéré et facile à cultiver, il sera bien drainé mais retiendra peu d'eau, qui y circulera rapidement ;
- Tandis qu'un sol fin ou argileux retiendra beaucoup d'eau, deviendra plastique et collant humide, puis compact et dur en séchant. On parle de sol « lourd » même si sa densité est en fait souvent moindre.

#### I.3.2. La structure du sol :

Elle est conditionnée par les colloïdes : argiles, substances humiques hydroxydes. Les argiles favorisent la fragmentation du sol en produisant des fentes de retrait à la dessiccation. Elles peuvent enrober les autres particules et colmater les pores. Elles peuvent fixer des composés organiques par adsorption sur leurs feuillets par l'intermédiaire des oxyhydroxydes d'Al et de Fer qui forment un revêtement pelliculaire. Ces complexes organo-minéraux (ou argilo-humiques) sont agglomérés en agrégats incorporant des filaments mycéliens et des bactéries à polysaccharides (Figure N°I.3). Il

faut maintenir un niveau adéquat de matière organique dans le sol pour conserver une bonne structure de sol et ainsi éviter des problèmes de compaction et de durcissement de la surface du sol. Les facteurs ayant une incidence sur la structure sont :

- infiltration de l'eau et drainage;
- rétention de l'eau;
- aération;
- potentiel d'érosion du sol;
- germination des semences;
- croissance des racines (<http://w.ww.qfa.ql.ca/agrenv/fr/compaction.html>).

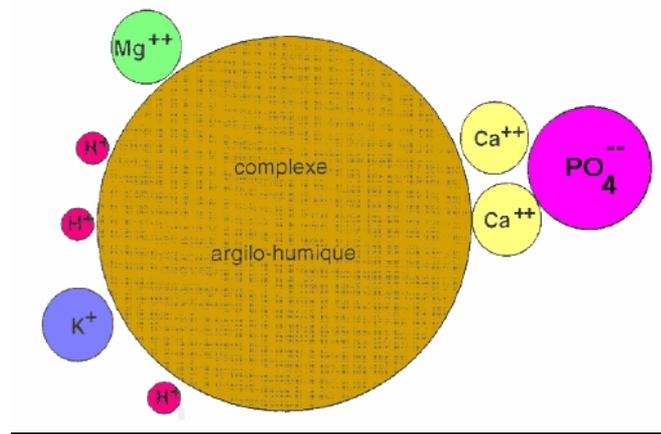


Figure I.3: Fixation des ions sur le complexe argilo-humique (Morel, 1996).

### I.3.3 La porosité du sol :

Contrairement à celle d'un aquifère, la porosité du sol n'est pas saturée par l'eau, elle contient de l'air dont l'oxygène est utilisé par les racines et l'activité microbienne. L'objectif de l'irrigation et du drainage des sols est le maintien de l'équilibre eau air. Cette proportion d'eau et d'air dans la porosité du sol détermine les phénomènes d'aérobiose ou d'anaérobiose. Les conditions idéales de fonctionnement biologique sont réalisées lorsqu'il y a, à la fois, de l'air dans le système et de l'eau disponible (Lemière et al, 2001 ; Chaussod, 1996).

### I.3.4. La perméabilité du sol :

Il s'agit de l'aptitude d'un sol, d'un sédiment, d'un réservoir à se laisser traîner par l'eau, sous l'effet d'un gradient hydraulique. Elle exprime la résistance d'un milieu à l'écoulement

de l'eau qui le traverse. Elle dépend de la structure et de la texture du sol considéré (AFEE, 1989a).

### I.3.5 La capacité d'échange des sols :

C'est la principale propriété chimique qui caractérise le sol, par rapport à une roche mère qui en est le plus souvent dépourvue. Elle exprime le nombre d'ions échangeables par unité de poids de sol. Selon les ions mis en jeu (Comeau, 1999 ; Robert, 1996), on distingue

- La capacité d'échange cationique : elle est très dépendante de la texture du sol, et plus particulièrement de la teneur en argile et en matière organique. Cependant, selon la nature des argiles, la capacité d'échange liée à la charge négative, peut varier de 10 à 100 méq/100g. la matière organique a une capacité d'échange cinq fois plus supérieure à celle des argiles, mais là encore une grande variabilité est possible.
- La capacité d'échange anionique : selon l'état des anions, on a deux situations :
  - Soit les anions sont actifs comme les acides humiques et fulviques ou les phosphates et les échanges ne sont que faiblement réversibles. On parlera de capacité d'adsorption ou de fixation pour les phosphates, ceux-ci, se fixent sur les calcites, oxydes hydroxydes de fer et d'aluminium, c'est à dire les charges positive, mais en conduisant à la formation de liaisons fortes, souvent de type covalente ;
  - Soit les anions sont inactifs comme  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{NO}_3^-$ . Les liaisons mises en jeu sont de nature électrostatique, c'est à dire relativement faibles et réversibles.

### I.3.6 Le pH des sols :

C'est une autre propriété chimique essentielle qui détermine le comportement des éléments chimiques et en particulier leur existence sous forme cationique ou anionique ou sous la forme d'hydroxyde, mais aussi le comportement des microorganismes dont les optimaux de leurs activités se situent entre 6,5 et 8,5 (Davet, 1996 ; Robert, 1996).

### I.3.7 Le pouvoir tampon des sols :

Il constitue une autre propriété importante des sols qui va déterminer leur aptitude à neutraliser

neutraliser l'acidité. Les carbonates constituent un premier système tampon, les silicates qui contiennent des cations basiques échangeables ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) constituent eux aussi une réserve et une source de cations échangeables avec les protons qui s'opposent à l'acidification. Mais aussi, c'est la capacité d'échange des argiles qui constituent le système tampon essentiel, les feuilles d'argile sont capables de capter des protons, ainsi, le pH à leur voisinage peut être inférieur à celui de la solution qui baigne. Ceci évite aux microorganismes présents dans la phase liquide du sol de subir de brusques variations de pH. Cet effet tampon est d'autant plus prononcé que la capacité d'échange est plus grande (Davet, 1996 ; Robert, 1996).

### I.4. LES COMPOSANTS VIVANTS DU SOL :

Le sol est un milieu vivant et c'est l'une des caractéristiques essentielle qui le différencie d'une roche, où les êtres vivants sont présents qu'en surface (Robert, 1996).

En dehors des racines des plantes, qui peuvent être considérées comme des organismes vivants à part entière, la diversité et l'importance quantitative des organismes au sol dépasse de très loin ce que l'on peut imaginer. Le tableau I.3 rappelle brièvement et très schématiquement quelques ordres de grandeurs (Chaussod, 1996).

Tableau I.3 : Principaux organismes macroscopiques du sol (Chaussod, 1996).

Type d'organisme	Nombre par m <sup>2</sup>
<b>organismes macroscopiques</b>	
Semences de mauvaises herbes	10 <sup>3</sup> à 10 <sup>4</sup>
Lombriciens	10 à 10 <sup>3</sup>
Mollusques	10 <sup>2</sup> à 10 <sup>3</sup>
Enchytrides	10 <sup>2</sup> à 10 <sup>5</sup>
Arthropodes >1 mm	10 <sup>2</sup> à 10 <sup>3</sup>
Arthropodes <1 mm	10 <sup>3</sup> à 10 <sup>4</sup>
Nématodes	10 <sup>6</sup> à 10 <sup>8</sup>
<b>organismes microscopiques</b>	
Protozoaires	10 <sup>3</sup> à 10 <sup>5</sup>
Algues	10 <sup>2</sup> à 10 <sup>4</sup>
Bactéries	10 <sup>8</sup> à 10 <sup>9</sup>
Champignons	10 <sup>4</sup> à 10 <sup>5</sup>

Dans le sol, les microorganismes jouent un rôle essentiel dans les cycles biologiques du sol pourvu que les conditions physico-chimiques leur soient favorables. Or, ils sont actifs dans de larges gammes de conditions de pH, d'aération, de température, d'humidité. Les conditions les plus favorables se rencontrent à la surface du sol où la présence de matières organiques (humus) permet aux microorganismes aérobies de croître.

Il faut noter que, les milieux permettant la survie de bactéries aérobies favorisent une biodégradation plus grande que les milieux anaérobies (d'où la nécessité d'une bonne aération du milieu), il est tout de même important de préciser que par cette activité continue, les microorganismes sont susceptibles d'affecter les conditions chimiques du milieu (AFEE, 1989a).

Les modifications des caractéristiques physico-chimiques du milieu sous l'effet des microorganismes sont les suivantes :

a) effet sur le pH : par leur action sur les composés minéraux ou organiques, les microorganismes peuvent modifier le pH du sol de façon ponctuelle ou au contraire d'une manière telle que les conséquences peuvent en être importantes pour l'ensemble de l'écosystème (Davet, 1996) ;

b) effet sur la structure du sol : la qualité de la structure d'un sol dépendait de la stabilité de ses agrégats, cette stabilité résulte elle-même pour une large part de l'activité des microorganismes (Davet, 1996) ;

c) les cycles minéraux : les communautés microbiennes jouent un rôle absolument capital dans le recyclage de la matière organique. Elles assurent le renouvellement de la plupart des ions minéraux du sol. Sachant que dans un sol bien équilibré, la biomasse microbienne se comporte comme un réservoir d'éléments minéraux (elle les maintient dans les horizons supérieur du sol, les protège du lessivage, et les restitue progressivement aux plantes) (Davet, 1996).

d) action sur les composés xénobiotiques : la durée de vie dans le sol des composés xénobiotiques est extrêmement variable. Certaines matières plastiques hautement polymérisées sont d'une longévité exceptionnelle. D'autres produits organiques de synthèse peuvent être au contraire très rapidement minéralisés et recyclés. Cette minéralisation est d'origine à la fois physico-chimique et biologique (Davet, 1996).

En plus des synthèses et des dégradations résultantes de l'activité des microorganismes, de la flore et de la faune, le sol est le siège d'une activité enzymatique propre. Ces enzymes proviennent en partie des plantes et des animaux mais la majorité sont d'origine microbienne.

Les principales enzymes mises en évidence dans le sol sont les suivantes :

- oxydoréductases : déhydrogénases, glucose oxydase, aldéhyde oxydase, phénol oxydase, catalase, nitrate-reductase;

- transférases : dextrane-sucrase, aminotransférase ;

- hydrolases : carboxylestérases, lipase, phosphatase, amylase, cellulase, protéinases...etc. ;

- lyases : décarboxylases.

En fait, les enzymes ne demeurent pas longtemps libres dans le sol. Comme toutes les molécules organiques, elles peuvent soit servir de substrats à des microorganismes et disparaître, soit être dégradées par les protéases du sol ou subir une dénaturation physico-chimique, soit s'adsorber sur le complexe argilo-humique. Dans ce cas, elles sont, soit piégées à l'intérieur des feuilles d'argiles, soit enrobées de matières organiques, soit encore fixées sur les surfaces externes des particules minérales ou organiques. Ces phénomènes d'adsorption ont des conséquences importantes (Davet, 1996) :

- protection contre la dégradation, nous citerons le cas de l'urease adsorbée sur la fraction organique du sol résistera à la dénaturation par la chaleur et la protéolyse;

- modification de l'activité enzymatique : c'est le cas de la catalase adsorbée sur les particules d'argile est quatre fois plus active que la catalase libre;

- les enzymes adsorbées ont un rôle écologique très important puisqu'elles permettent aux microorganismes de réaliser des économies d'énergie considérables.

### I.5 MECANISMES DE L'EPURATION DANS LES SOLS :

L'épuration dans le sol n'est active que grâce à l'intervention de mécanismes liés à ses propriétés (physiques, hydrodynamiques, cinématiques, physico-chimiques et biologiques).

L'action épuratrice est donc due à la nature même du sol ainsi qu'au rôle joué par les végétaux et les microorganismes qui lui sont associés.

Les processus fondamentaux contribuant à l'autoépuration du sol sont évoqués dans ce qui suit (AFEE, 1989a):

### I.5.1 La filtration :

Il s'agit d'un phénomène mécanique dépendant de la texture et de la structure des sols qui le conditionne (la taille, la forme et la quantité des pores, donc la capacité de filtration du sol). Ainsi un sol à dominance sableuse permettra une migration plus facile des éléments fins qu'un type de sol à dominance limoneuse.

L'aptitude à la filtration d'un sol peut se déduire d'étude de la perméabilité.

Les grosses particules apportées, lors d'un épandage par exemple, seront arrêtées en surface. Ainsi, les matières en suspension et organismes tels que ciliés, nématodes et œufs seront facilement retenus. Par contre, les particules plus fines pourront pénétrer dans le sol plus profondément, en se limitant toutefois à de courtes distances.

Les bactéries seront facilement absorbées par le terrain, c'est pourquoi leur densité diminue rapidement dans le sous-sol, leur migration dépend en fait :

- ❖ de la vitesse d'infiltration ;
- ❖ de la quantité d'effluent apporté ;
- ❖ du temps de vie des organismes

Cette migration ne dépasse que rarement quelques mètres, les bactéries d'origines fécales ne parcourent pas plus de 2 à 3 mètres en bassin d'infiltration. Les virus, en raison de leur taille inférieure, peuvent se propager plus loin.

Cette propriété du sol limiterait ainsi les risques de contamination des eaux souterraines par les microorganismes. Toutefois, il est actuellement reconnu que bactéries et virus peuvent parcourir de longues distances dans les aquifères et sols saturés.

Il est important de préciser que l'utilisation excessive de ce mécanisme d'épuration, par épandage fréquent d'eaux usées par exemple, implique le colmatage du sol par accumulation de matière à la surface et dans ses pores (matières en suspension, matières organiques dont la fermentation déclenche des processus de prolifération microbienne) (AFEE, 1989a).

### I.5.2 La rétention et la transmission de l'eau :

En ce qui concerne l'épuration, le temps de contact effluent/sol doit être suffisamment grand. En effet, la rétention de l'eau apportée, dans la zone prospectée par les racines des

cultures, est un phénomène nécessaire pour que l'eau d'épandage et les éléments qui l'accompagnent puissent être à la disposition des microorganismes dégradants la matière organique, racines et colloïdes du sol (pouvant fixer certains éléments). La majorité des éléments apportés ont, grâce à cette propriété du sol, plus de chance d'être réutilisés avant le drainage hivernal, ce qui limite les risques de pollution des nappes d'eau souterraines (AFEE, 1989a).

### I.5.3 L'aération :

L'air pourra permettre l'aération de l'eau résiduaire retenue dans les pores du sol. Une aération suffisante est la condition indispensable au maintien de l'activité biologique du sol. Elle assure également la respiration des racines des espèces végétales et entretient de la sorte un des aspects du pouvoir épurateur du sol. L'aération conditionne l'évolution des matières fermentescibles apportées par l'eau résiduaire. Lorsqu'elle devient insuffisante, à la suite de colmatage ou de dégradation de la culture du sol, les fermentations anaérobies l'emportent sur les aérobies.

Le renouvellement de l'oxygène se fait principalement par diffusion et dépend de l'humidité du sol. C'est de l'aération du sol, de son humidité, qui va dépendre l'activité de la microflore sur les matières dissoutes apportées par l'eau résiduaire, d'où son rôle primordial dans l'épuration (AFEE, 1989a).

### I.5.4 Les échanges d'ions et l'adsorption :

Les complexes argilo-humiques jouent le rôle de capteur d'ions et interviennent ainsi dans l'action épuratrice du sol. Les oxydes et les hydroxydes libres interviennent principalement au niveau des métaux lourds. Par contre, leur association avec les argiles est très efficace (pour les métaux lourds et les pesticides) (AFEE, 1989a).

### I.5.5 L'action de la microflore du sol :

La dégradation chimique des polluants est essentiellement due à l'activité des microorganismes d'où son rôle dans l'épuration des sols (AFEE, 1989a).

### I.5.6 Le rôle des plantes :

Dans l'utilisation du sol comme système épurateur, le rôle des végétaux sera très important puisqu'ils représentent par leur prélèvement, la seule véritable épuration qui empêchera l'entraînement en profondeur des éléments minéraux apportés (AFEE, 1989a).

### I.5.7 L'intervention de la faune :

Il s'agit de mettre en évidence le rôle primordial des vers de terre au niveau du sol. En effet, les vers en sont les principaux laboureurs et ils entretiennent de la sorte son aération, leur utilisation s'avère efficace vis à vis de l'épandage des boues. La nature même du sol lui donne donc la possibilité d'épurer les effluents qui le traversent (AFEE, 1989a).

## Chapitre II

# Le pétrole

Les hydrocarbures sont les polluants organiques les plus fréquents, étant donné le rôle fondamental des produits pétroliers dans l'économie moderne et les quantités énormes utilisées dans le monde, en particulier pour la production d'énergie (Vandecasteele et Ballerini, 2001).

La connaissance de la structure des hydrocarbures est essentielle à la compréhension des différentes voies d'attaques par les microorganismes. C'est pourquoi, nous avons choisi d'évoquer brièvement la composition du pétrole brut et ses dérivés, avant de décrire ultérieurement le chapitre de la biodégradation.

### II.1-DEFINITION :

Le mot «pétrole» est composé à partir des deux mots latins *petra* et *oleum*, qui signifient littéralement «huile de pierre». En effet, on trouve le pétrole sous forme liquide plus ou moins visqueux, souvent de couleur foncée et d'odeur caractéristique, mais il existe également sous forme gazeuse ou solide (Zorzi et Heyen, 2001 ; <http://fr.encyclopédia.yahoo.com/articles/>).

### II.2-LA COMPOSITION

La composition du pétrole brut varie avec les origines géographiques. Il est essentiellement constitué par des hydrocarbures dont les molécules sont une association de carbone (83 à 88%) et d'hydrogène (11 à 14%), viennent s'ajouter à cela des composés oxygénés (0,1 à 0,5%), azotés (0,05 à 0,5%) et soufrés (0,01 à 6 %). Enfin, il renferme également des traces de métaux et en particulier du vanadium (Laurent, 2004, Lalumière et Richard, 2002; Favennec, 1998 ; Enspm, 1993)

Les hydrocarbures constituant le pétrole peuvent se ranger dans trois grandes familles:

- Les paraffines, composées d'un enchaînement d'atomes de carbone auxquels sont attachés des atomes d'hydrogène, leur formule générale est:  $C_nH_{2n+2}$

La paraffine la plus simple est le méthane (CH<sub>4</sub>). Sa température d'ébullition est très basse :

-162°C. C'est le constituant principal du gaz naturel. La température d'ébullition augmente avec le nombre d'atomes de carbone : éthane (-89°C), propane (-42°C), isobutane (-12°C), butane (-1°C). Les paraffines comportant jusqu'à 4 atomes de carbone sont gazeuses à la température ambiante. Celles comportant de 5 à 20 atomes de carbone sont liquides. Les plus lourdes sont solides. Le tableau II.1 présente quelques propriétés physiques de certains alcanes (Zorzi et Heyen, 2001 ; Roussel et Boulet, 1994).

Tableau N°II.1 : Propriétés physiques de certaines paraffines (Roussel et Boulet, 1994).

	<b>Formule globale</b>	<b>Masse molaire</b>	<b>Température d'ébullition °C (1 atm)</b>	<b>Densité</b>
Méthane	CH <sub>4</sub>	16	-161,5	0,260
Ethane	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	30,1	-88,6	0,377
Propane	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	44,1	-42,1	0,508
n-Butane	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	58,1	-0,5	0,585
IsoButane	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	58,1	-11,7	0,563
n-Pentane	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	72,1	36,1	0,631
n-Héptane	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	100,2	98,4	0,688

- Les naphènes, comportent des atomes de carbone arrangés en cycles, sur lesquels peuvent se greffer des chaînes linéaires, leur formule générale est: C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>

La température d'ébullition est supérieure à celles des alcanes à même nombre d'atomes de carbone, les constantes physiques de quelques cyclanes sont présentées dans le tableau II.2. Dans les cyclanes à 4 et 5 cycles, on trouve les hydrocarbures ayant conservé, en partie, la structure de la matière vivante à l'origine de la formation du pétrole (stéranes, hopanes), ce sont des marqueurs biochimiques (Zorzi et Heyen, 2001 ; Roussel et Boulet, 1994).

Tableau N°II.2 : Constantes physiques de quelques cyclanes (Roussel et Boulet, 1994).

	<b>Formule globale</b>	<b>Masse molaire</b>	<b>Température d'ébullition °C (1 atm)</b>	<b>Densité</b>
Cyclopentane	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70,1	49,3	0,750
Méthylcyclopentane	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	84,2	71,8	0,753
Cyclohexane	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	84,2	80,7	0,783
Méthylcyclohexane	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub>	98,2	100,9	0,774

- Les molécules aromatiques comportent des cycles dérivés du benzène C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> dont la formule générale est: C<sub>n</sub>H<sub>2n-6</sub>

Sur ce cycle se greffent une large variété de substituant, on distingue:

- *Les radicaux hydrocarbures aliphatiques (méthyle, éthyle...etc.) qui forment l'essentiel de ce groupe ; par exemple: le toluène;*
- le chlore et autres halogénures donnant notamment la famille des chlorobenzènes
- l'alcool, qui forme le groupe phénol ;
- le nitrate, qui confère des propriétés explosives ;
- un deuxième cycle benzénique qui va se fusionner avec le premier cycle pour donner des hydrocarbures polyaromatiques (HAP), par exemple : le naphthalène, l'anthracène...etc. Il existe d'autres HAP ayant sur les noyaux aromatiques des groupements alkyles ( $C_nH_{2n+1}$ ) ou, dans la structure aromatique, des atomes de soufre, azote, oxygène.

Les hydrocarbures aromatiques sont présents en forte concentration dans les pétroles bruts.

Le tableau II.3 réunit quelques informations sur ces hydrocarbures aromatiques

(Zorzi et Heyen, 2001 ; Lemièrre, 2001 ; Roussel et Boulet, 1994).

Tableau N° II.3 : Constantes physiques de quelques aromatiques (Roussel et Boulet, 1994).

	<b>Formule globale</b>	<b>Masse molaire</b>	<b>Température d'ébullition °C (1 atm)</b>	<b>Densité</b>
Benzène	$C_6H_6$	78,1	80,1	0,884
Toluène	$C_7H_8$	92,1	110,6	0,871
Ethyl-benzène	$C_8H_{10}$	106,2	136,2	0,871
O-Xylène	$C_8H_{10}$	106,2	144,4	0,884
M-Xylène	$C_8H_{10}$	106,2	139,1	0,868
P-Xylène	$C_8H_{10}$	106,2	138,4	0,865

### II.3- LA GENESE DU PETROLE

Elle a suscité de nombreux travaux et de nombreuses hypothèses ont été proposées. L'hypothèse la plus reconnue par les géologues sur la naissance du pétrole, repose sur la théorie biogénique.

Le pétrole s'est formé, il y a 20 à 350 millions d'années, dans les bassins sédimentaires peu profonds des océans. Les plus anciens gisements connus remontent à

quelque 500 millions d'années, les plus récents à 4000 ans à peine. A cette époque, des micro-organismes, animaux et végétaux (le plancton), lorsqu'ils mouraient, leurs restes se déposaient au fond des océans, où ils se sont accumulés et mélangés aux boues sous-marines pour former des couches de sédiments riches en matières organiques. Cette dernière est dégradée sous l'action des bactéries à l'abri de l'oxygène, en une substance brunâtre complexe, appelée le kérogène qui est le précurseur du pétrole.

Ainsi, les couches de sédiments formées s'enfoncent et se consolident, se transformant peu à peu en roches sédimentaires: c'est ce qu'on appelle la diagenèse. Le kérogène est alors porté à des températures et à des pressions de plus en plus intenses, qui cassent les molécules et les réorganisent, donnant naissance aux hydrocarbures du pétrole. Au-delà d'une certaine profondeur, ces phénomènes sont si intenses que les seules molécules qui subsistent sont des gaz et qu'il ne reste aucun hydrocarbure liquide (Figure N°II.1) (UP, 2003 ; Lalumière et Richard, 2002 ; <http://fr.encyclopédia.yahoo.com/articles/>).

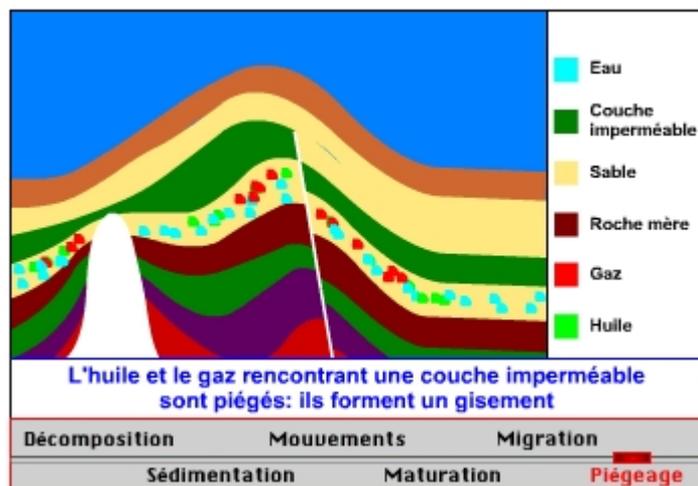


Figure N°II.1 la genèse du pétrole

### II.4-LE RAFFINAGE DU PETROLE

Une fois le pétrole extrait d'un gisement, il est quasiment inutilisable à l'état brut. En revanche, traité par procédés de distillation et de raffinage, il procure une gamme étendue de produits précieux (voir tableau II.4). Lors de la distillation, le pétrole brut est séparé en diverses fractions présentant chacune températures d'ébullition (Figure N°II.2). On obtient ainsi (Laurent, 2004 ; UP, 2004) :

II.4.1 Gaz liquéfié : Le gaz de pétrole liquéfié (GPL) se compose des fractions les plus légères du pétrole (C1-C4). Il se présente sous forme gazeuse à température ambiante. Ce sont des hydrocarbures issus du raffinage qui se liquéfient à une pression relativement faible et qu'on stocke dans des citernes. Il est utilisé comme gaz combustibles (méthane, éthane, propane, butane, ...) et comme matières premières pour la pétrochimie. Aujourd'hui, le gaz liquéfié joue aussi un rôle de plus en plus important en tant que carburant automobile, car les voitures à gaz dégagent nettement moins de CO<sub>2</sub> et de polluants que les voitures à essence et à carburant diesel (UP, 2004 ; Zorzi et Heyen, 2001).

Tableau n°II.4: Composition des produits pétroliers (Jegaden, 2004 ; Lemièrre et al, 2001).

Fraction de distillation de pétrole	Composés organiques	Utilisation
Gaz naturel	C1-C2	Gaz combustible
Gaz liquéfié	C3-C4	Pétrochimie- Gaz combustible
Ether de pétrole	C4-C5	Solvants
Essences	C5-C10	Essence aviation- Essence voiture
Naphta	C6-C10	Solvants- Fluide de nettoyage
Kérosènes	C5-C16	Carburants aviation
Gas oil	C9-C16	Diesel- Carburants marins
Paraffines	C20...	Fuels lourds
Goudrons	C20-C40	Asphalte, bitumes, revêtements Routiers et couverture, étanchéité, protection

II.4.2 L'essence : L'essence est le carburant le plus vendu au monde. Il désigne une coupe pétrolière légère contenant des hydrocarbures dans la gamme (C5-C11), tirées de la distillation du brut à des températures relativement basses (35°C à 180°C). Plus précisément on peut distinguer :

- l'essence légère de distillation directe regroupant les C5 et C6, composé d'alcane (30-70°C)
- l'essence lourde de distillation directe regroupant les molécules entre C7 et C10 ou C11 (70-205°C).

La plus grande part de ces fractions subiront encore d'autres traitements, puis seront mélangées pour donner de l'essence pour moteurs. A partir de ce distillat, on produit également de l'essence d'aviation (carburant utilisé pour avions légers), ainsi que des

essences spéciales pour l'industrie chimique (Badarou et Seddor, 2004 ; UP, 2004 ; Favennec, 1998).

II.4.3 Le kérosène : Durant le XIX<sup>e</sup> siècle, le kérosène, appelé aussi pétrole lampant, était presque exclusivement utilisé à des fins d'éclairage. Ce ne fut qu'à partir des années 1950 qu'il trouva une importance industrielle, car les carburants employés dans les avions à réaction sont fabriqués avec du kérosène et il est utilisé comme combustible pour le chauffage domestique. Il est plus lourd que l'essence (C11-C15), et son point d'ébullition est plus élevé (entre 180°C et 230°C) (Laurent, 2004 ; UP, 2004 ; <http://fr.encyclopedia.yahoo.com/articles/>).

II.4.4 Diesel : Le diesel, appelé gazole en France, est le carburant par excellence des poids lourds, des autobus, des bateaux, des machines agricoles et de chantiers. Grâce à des progrès techniques notables, des moteurs diesel économiques équipent de plus en plus les voitures de tourisme.

Le carburant diesel se compose – comme le mazout – de chaînes d'hydrocarbures longs (C12 - C17). Lors de la distillation, son point d'ébullition se situe dans une plage moyenne de 250°C à 360°C (voir tableau II.5) (UP, 2004; Laurent, 2004).

**Tableau n°II.5 : Spécification du Gasoil (Badarou et Seddor, 2004).**

Densité à 15°C suivant la provenance	0,810/0,855/0,880
Couleur	Brun ambré, jaune pâle
	Distillation
65% vol	250°C mini
90% suivant la provenance	357°C/362°C
Point final	385°C maxi
Flash point suivant la provenance	61°C/65°C/66°C mini
Tourpoint	-9 maxi
Teneur en soufre : % poids	0,5 maxi
Diesel index	53 mini
Indice de cétane suivant la provenance	45 à 50 mini
Viscosité à 38,8°C suivant la provenance	1 ;1,6 ;5 ;9 cst
Acidité totale mg/koh/gr	1,15 maxi
Teneur en cendres : % poids	0,01 maxi
Teneur en eau : % vol	0,05 maxi

II.4.5 Mazout : Le mazout (huile de chauffage extra-légère HEL) représente 40% des ventes intérieures de produits pétroliers. Le mazout compte parmi les distillats de densité moyenne, tirés du brut à des températures moyennes. Le terme anglais de gasoil désigne globalement les deux produits, mazout et diesel. Pour le différencier du carburant diesel, le mazout est marqué d'une substance chimique et colorée en rouge.

Par rapport à d'autres combustibles, le mazout présente un pouvoir calorifique extrêmement élevé. Il doit résister au froid et, dans une large mesure, brûler sans laisser de résidus (UP, 2004).

II.4.6 Huile de chauffage lourde : L'huile de chauffage lourde, appelée fioul lourd en France, se compose de chaînes moléculaires longues (C30-C50), qui n'atteignent leur degré d'ébullition qu'à partir de 350°C. Ce combustible visqueux, formé d'un mélange de produits résiduels, doit être préchauffé pour qu'on puisse le transporter et le brûler. On l'utilise avant tout dans l'industrie - cimenteries, tuileries, fabriques de verre, de papier et carton – ou dans des centrales thermiques pour la production d'électricité (UP, 2004 ; Zorzi et Heyen, 2001).

II.4.7 Lubrifiants : Au pied de distillation, on récupère un résidu qu'il est impossible de distiller à pression atmosphérique sans risque de le décomposer. Ce résidu est donc envoyé dans un second four et dans une tour à distiller qui fonctionne sous vide. Les fractions légères de cette seconde distillation sont les huiles légères (C18-C25, ébullition 300-400°C) ou "lubrifiants légers". La fraction suivante (C26-C36, ébullition 400-500°C) est constituée par les "lubrifiants moyens et lourds", composés de cire de paraffines et d'hydrocarbures plus légers (Laurent, 2004).

II.4.8 L'asphalte : C'est la fraction la plus lourde des produits pétroliers (C>50), résidu de la distillation sous vide comporte une partie solide appelée "asphalte" d'où l'on tire les bitumes routiers (Roussel et Boulet, 1994 ; Zorzi et Heyen, 2001 ; Laurent, 2004).

## II.5-LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU PETROLE BRUT :

Les caractéristiques physiques et chimiques du pétrole brut et du pétrole raffiné diffèrent, ces caractéristiques influencent leur volatilité, leur toxicité ainsi que le taux et la durée de l'altération. Les propriétés dont il faut tenir compte pour les interventions en cas de déversement sont (Russell, 1999) :

**II.5.1 Densité :** La densité de l'hydrocarbure détermine s'il flotte ou non. La densité de la plupart des pétroles, bruts et raffinés, se situe entre 0,78 et 1,00. L'industrie pétrolière utilise couramment l'indice API (degré densité API), de sorte que, sur l'échelle API, les hydrocarbures légers avec une faible densité ( $<0,8$ ) ont des valeurs élevées sur l'échelle API ( $>45$ ), alors que les hydrocarbures plus lourds ont une faible densité API. Avec la densité API, la plupart des hydrocarbures se situent dans un intervalle commode de 10 – 50° API. La densité du pétrole répandu augmente avec le temps, à mesure que disparaissent les composants plus volatiles (et moins denses). La densité du pétrole brut de Hassi Messoud est de 0.804 (Chatila, 1994; Russell, 1999).

**II.5.2 Point d'écoulement :** La température la plus basse à laquelle le pétrole coule; sous ce seuil, le pétrole prend la forme d'une substance semi-solide. Selon la température ambiante, le pétrole échoué peut alterner entre un état fluide ou semi solide. Cette propriété détermine si le pétrole pénètre dans les sédiments ou suit la pente en s'écoulant. Le point d'écoulement des pétroles bruts algériens se situe entre  $-24^{\circ}\text{C}$  et  $-60^{\circ}\text{C}$  (Chatila, 1994; Russell, 1999).

**II.5.3 Viscosité :** Une mesure de la résistance des hydrocarbures à l'écoulement, ou de leur cohésion interne; la viscosité contrôle la vitesse d'étalement et le degré de pénétration du pétrole dans les sédiments. Les hydrocarbures à faible viscosité sont légers et fluides tandis que ceux à haute viscosité sont semi-solides ou goudronneux. La viscosité du pétrole brut de Zarzaitine (Algérie) est de  $5\text{mm}^2/\text{s}$  (Chatila, 1994; Russell, 1999).

**II.5.4  $\text{H}_2\text{S}$  :** À la différence d'autres composés sulfurés dans le pétrole brut qui tendent à s'accumuler dans le résidu de distillation, l'hydrogène sulfuré se produit au cours de la distillation ou d'autres processus de chauffage. Au cours d'un déversement d'hydrocarbures, ce facteur est un élément de préoccupation pour la sécurité car l'hydrogène sulfuré est un gaz dont la toxicité est fonction de la concentration et du temps d'exposition (Russell, 1999).

Parmi les autres propriétés des hydrocarbures dont il faut tenir compte pour les mesures d'interventions se trouvent le point d'ébullition, le point éclair, la tension superficielle, l'adhésion, la solubilité et le contenu aromatique (Russell, 1999).

**II.5.5 Point d'ébullition :** Il détermine la température d'évaporation de chaque hydrocarbure. Un grand nombre de fractions légères (à basse température d'ébullition) s'évaporent à des températures inférieures à  $20^{\circ}\text{C}$  ( $68^{\circ}\text{F}$ ). Avec l'évaporation de ces fractions légères, le volume du pétrole diminue et il devient plus dense et plus visqueux (Russell, 1999).

II.5.6 Point éclair : La température la plus basse à laquelle les fractions du pétrole prendront feu quand elles sont exposées à une source de combustion. Il s'agit ici d'un paramètre critique de sécurité. On doit se souvenir qu'il existe un sérieux danger si les températures de l'air sont supérieures aux points éclair des fractions légères contenues dans les déversements d'hydrocarbures. L'essence et d'autres fuels légers peuvent s'enflammer sous la plupart des conditions ambiantes et posent donc un danger grave lors de tout déversement. Un grand nombre d'hydrocarbures qui viennent de se répandre ont également des points éclair peu élevés jusqu'à ce que les composants plus légers s'évaporent ou se dispersent. Le point éclair du pétrole brut de Hassi Messoud est  $<20^{\circ}\text{C}$  (Chatila, 1994; Russell, 1999).

II.5.7 Tension superficielle : Elle contrôle la vitesse à laquelle s'étale l'hydrocarbure. Les hydrocarbures à faible tension superficielle s'étalent plus rapidement. Il s'ensuit qu'une plus grande superficie est exposée à l'altération. La tension superficielle est en partie déterminée par la température ambiante et diminue avec l'augmentation de la température (Russell, 1999).

- Adhésion : Cet élément est important pour déterminer si le pétrole adhère aux sédiments ou aux autres substances avec lesquelles il entre en contact (Russell, 1999).
- Solubilité : Elle détermine si le pétrole se dissout dans l'eau et devient toxique pour la faune et flore marine (Russell, 1999).
- Contenu aromatique : les aromatiques sont plus toxiques et présentent une haute solubilité qui peut accroître les effets toxiques; en outre, ils sont plus volatils que d'autres composants des hydrocarbures (Russell, 1999).

Il est aussi important de se souvenir que ces propriétés et les conditions de l'environnement qui les affectent changent avec le temps et qu'ils doivent donc faire l'objet de surveillance continue. Par exemple, au fur et à mesure que l'altération du pétrole prend place par évaporation, sa densité augmente. Le taux d'évaporation s'accélère avec l'augmentation de la température et de la vitesse du vent (Russell, 1999).

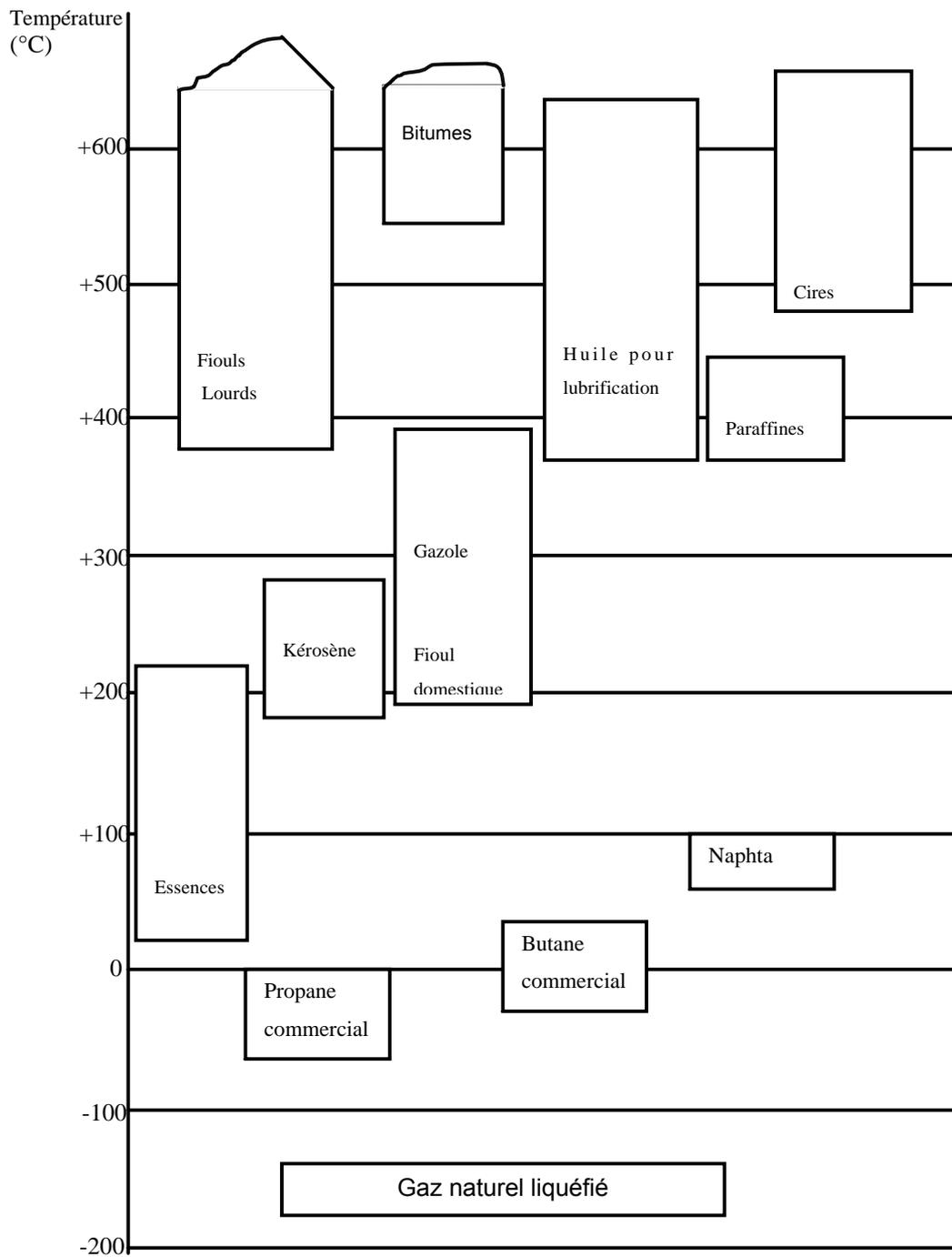


Figure II.2 : Intervalles de distillation des coupes pétrolières (Vogel et Ballerini, 2001).

## CHAPITRE III

### La biodégradation des hydrocarbures

Le devenir des produits pétroliers rejetés dans l'environnement est principalement gouverné par le processus de biodégradation. L'existence de ce phénomène dépend de la biodégradabilité intrinsèque du polluant mais aussi de la présence de microflore dégradatrices compétentes dans les sols et les eaux souterraines (Solano-Serena et al, 2001). Les interactions physiques, métaboliques et de la communauté microbienne contribuent à la nature dynamique de ce système, utilisant différentes méthodes pour accéder aux hydrocarbures. Une compréhension de ces interactions est nécessaire aux développements des techniques de traitement pour la biodégradation des hydrocarbures (Van Hamme et Ward, 2001).

Au cours de ce chapitre, nous donnerons un aperçu sur les mécanismes d'accès aux hydrocarbures et les différentes voies métaboliques de la biodégradation des hydrocarbures.

#### I- Mécanisme d'accès aux hydrocarbures

Depuis longtemps, on a attribué la faible dégradation de plusieurs contaminants à leur récalcitrance (résistance à l'attaque enzymatique). Mais, depuis le début des années 90, c'est plutôt leur très basse hydro-solubilité qui expliquerait leur catabolisme difficile et limité (Comeau, 1999).

Selon Scott et Finnerty (1976a, b) le mécanisme d'accès impliqué dans le transport des hydrocarbures à travers la paroi est mal compris bien que des gouttelettes d'hydrocarbure soient fréquemment observées dans la cellule (Morgan et Watkinson, 1994).

Ainsi, du fait de la faible solubilité de la plupart des hydrocarbures, le mécanisme d'accès par les microorganismes peut se faire selon de nombreux auteurs par quatre modes :

1-Utilisation de la phase dissoute (le transfert par solubilisation dans la phase aqueuse) :

Ce modèle est celui généralement accepté pour la plupart des substrats. Une fois le substrat dissout assimilé, la bactérie ne peut utiliser que les molécules se solubilisant dans l'eau. Par exemple, il a été démontré que la solubilité et la vitesse de dissolution du naphthalène limitent la croissance d'une souche *Alcaligenes NP-ALK*. Au début, la faible densité cellulaire de la culture initiale permet une croissance exponentielle puisque la concentration de naphthalène dissous suffit aux besoins métaboliques. Lorsque la densité cellulaire augmente jusqu'à ce que les exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution, la biodisponibilité devient

alors limitante et la croissance linéaire. Cette dernière dépend alors de la vitesse de dissolution du naphthalène (Comeau, 1999).

### 2-Le transfert interfacial direct (TID) :

Dans ce cas le microorganisme ne produit pas de biosurfactant mais adhère du fait de sa forte hydrophobicité à l'interface phase hydrophobe/phase aqueuse (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

Ainsi selon Finnerty et Singer (1985) beaucoup de microorganismes dégradant des hydrocarbures ont des surfaces hydrophobes et peuvent donc s'associer aux gouttelettes d'hydrocarbure ou même entrer dans la phase organique pendant la culture. Singer et Finnerty(1984a) et Rateldge (1978) ont largement démontré que les changements étendus dans la composition des lipides de la membrane cellulaire peuvent se produire pendant la croissance sur des alcanes et ceci peuvent dans certains cas représenter des moyens afin d'augmenter l'association cellulaire avec la phase d'hydrocarbure. Kappeli et Finnerty (1979) ont décrit un système actif de transport employé par *Acinetobacter* HO1-N cultivé sur n-hexadécane (des gouttelettes d'hydrocarbure ont été encapsulées dans les microvésicules de membrane qui ont été alors pénétrées dans la cellule), on a également observé des structures intracellulaires, par exemple Watkinson (1980) a décrit un choix étendu de vésicule et de tubules intracellulaires dans le cas de *Nocardia* sp. Cooney et al (1980) ; Sumcker et Cooney (1981) ont rapporté l'accumulation des gouttelettes d'hydrocarbure dans les hyphes des *Cladosporium resinae* pendant la croissance sur des n-alcanes mais les mécanismes impliqués dans la pénétration ne sont pas clairs. Par la suite, Lindley et Heydeman (1986,1988) ont étudié *Cladosporium resinae* en détail et ont constaté que la prise des n-alcanes est un processus qui se déroule en deux étapes. Premièrement, l'hydrocarbure est passivement adsorbé sur la surface de la cellule ensuite transporté dans la cellule par un processus qui obéit à la cinétique de Michaelis Menten (Morgan et Watkinson, 1994).

### 3- Le transfert interfacial assisté par biosurfactants (TIA) :

Des biosurfactants sont produits par la bactérie. Ils ne sont pas indispensables au transfert qui s'effectue comme dans le cas précédent mais ils l'accélèrent de façon importante en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile (émulsification) (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

La formation d'une émulsion est souvent observée lors de la croissance de microorganismes

sur des hydrocarbures aliphatiques (huiles), dans ce cas la production de bioémulsifiant permet un accroissement du ratio surface/volume. Ceci augmente la surface disponible pour l'attachement direct des microorganismes au substrat (Comeau, 1999). L'émulsane est le bioémulsifiant le plus connu, sécrété par la souche *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (Foght et al, 1989 ; Hommel, 1994), ils existe aussi l'alsane sécrété par *Acinetobacter radioresistens* KA53, Barkay et al (1999) ont démontré que le complexe alsane augmente considérablement la solubilité des hydrocarbures polyaromatiques dans la phase aqueuse (Toren et al, 2002).

En plus, des bactéries un certain nombre de levures dégradant les n-alcanes sont capables de produire des bioémulsifiants telle que *Candida lipolytica* (le liposan) , *Saccharomyces cerevisiae* etc...(Hommel, 1994).

Iwabuchi et al (2000) ont observé qu'il existe une relation étroite entre la morphologie des colonies de *Rhodococcus rhodochrous* et la capacité de tolérer le pétrole. Ainsi, les souches issues des colonies de morphotype rugueux sont sensibles au n-hexadécane et la fraction aromatique du pétrole brut par rapport aux souches issues des colonies mucoidale lisse. Ceci est particulièrement dû à la production d'un polysaccharide extracellulaire « S-2 EPS » qui rend les cellules lisses résistantes. Iwabuchi et al (2002) ont constaté que l'utilisation de ce polysaccharide extracellulaire « S-2 EPS » stimule la dégradation de la fraction aromatique du pétrole brut « Arabian light », par les bactéries autochtones des eaux marines et proposent de l'utiliser dans la bioremediation des environnements marins contaminés par le pétrole.

#### 4- Le transfert micellaire (la pseudo-solubilisation) :

Certains microorganismes peuvent produire des biosurfactants qui solubiliseraient le substrat dans des micelles et que ces derniers seraient directement assimilés (Comeau, 1999). Koch et al (1991) ont obtenu un mutant Tn5 d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* dégradant des hydrocarbures qui ne pourrait pas se développer sur n-hexadécane. Ils ont constaté que la mutation avait eu comme conséquence une perte de production de biosurfactant. Ceci a entraîné la cessation complète de la prise des hydrocarbures. Goswami et Singh (1991) ont remarqué qu'un processus de pseudosolubilisation (formation de microémulsion) a été impliqué dans la prise du n-hexadécane. Ils ont étudié deux souches de *Pseudomonas* capables de croître sur cet hydrocarbure. Une souche s'est développée beaucoup plus rapide que l'autre avec un taux de croissance très élevée. Ceci est dû à la production simultanément d'un émulsifiant «une lipoprotéine» et un facteur de pseudosolubilisation «une glycoprotéine»

qui ont fonctionné synergiquement.

Il existe plusieurs microorganismes capables de produire des biosurfactants, par exemple : *Ustilago maydis* PRL-617, *Rhodococcus aurantiacus*, *Mycobacterium paraffinicum*, *Corynebacterium* spp, *Arthrobacter* sp, *Flavobacterium* sp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* etc... (Hommel, 1994 ; Bodour et al, 2003).

Les exemples les plus importants de tels microorganismes sont :

Les espèces de *Pseudomonas* produisant les rhamnolipides et les espèces de *Torulopsis* produisant les sophorolipides. Les biosurfactants de ces espèces sont extrêmement efficaces et créent les plus bas niveaux de tensions superficielles pour des concentrations inférieures que celles requises pour les agents tensioactifs synthétiques.

Il convient de noter que les rhamnolipides sont activement synthétisés au cours de la phase stationnaire de *Pseudomonas aeruginosa*. Par conséquent, elles sont également produites pendant la première étape du processus de la bioremediation et contribuent à la mobilisation et solubilisation des contaminants pendant les étapes de minéralisation (Chayabutra et Ju, 2000).

Dans le cas des champignons le mécanisme d'accession aux hydrocarbures est très mal compris, Kirk et Gordon (1988) ont observé que quelques souches des champignons marins dégradant les alcanes ont produit des biosurfactants pour émulsionner leurs substrats et que les microgouttelettes résultantes ont été alors entourés et pénétrés par des hyphes. Cependant, le mode du transport d'hydrocarbures dans la cellule n'a pas été déterminé (Morgan et Watkinson, 1994).

## II-Les voies métaboliques de la biodégradation

### 1. Dégradation des hydrocarbures saturés.

#### 1.1. Microorganismes

La biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. Les capacités des microorganismes eucaryotes plus restreintes seront mentionnées pour les classes d'hydrocarbures concernées. La dégradation des n-alcanes a été étudiée en détail. Une spécialisation nette des microorganismes selon les longueurs de chaîne des alcanes est une première caractéristique importante.

Des bactéries méthylophes strictes sont seules capables (hormis quelques levures) de dégrader le méthane. Elles sont très répandues reflétant la distribution du méthane dans l'environnement et appartiennent à cinq genres de bactéries gram-négatifs (*Methylobacter*,

Methylococcus, Methylomonas, Methylocystis, Methylosinus).

Les alcanes courts ( $C_2$ - $C_4$ ) sont dégradés par des bactéries appartenant aux genres *Mycobacterium* et *Nocardia* et par certains champignons (*Graphium* sp.).

Les alcanes à chaîne moyenne ( $C_5$ - $C_{10}$ ) sont utilisés notamment par des bactéries du genre *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et *P. putida*, *P. oleovorans*) ont été particulièrement étudiés.

Les alcanes à chaîne longue ( $C_{10}$ - $C_{20}$ ) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens. Les bactéries appartiennent en particulier au groupe *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* (CMN), notamment au genre *Rhodococcus* (c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes ( $C_{10}$  à  $C_{21}$ ) et à des températures allant de  $0^\circ$  à  $30^\circ$ ) mais aussi à des genres gram-négatifs (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*). Elles sont ubiquistes dans l'environnement comme le sont leurs substrats d'origine naturelle produits par les végétaux. Les n-alcanes à longue chaîne sont également d'excellents substrats pour plusieurs genres de levures (*Candida*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Torulopsis*).

Les alcanes à très longue chaîne ( $>C_{20}$ ) sont également dégradés par les microorganismes mais l'utilisation de ces substrats solides à température ambiante a été moins étudiée (Ballerini et Vandecasteele, 1999 ; Whyte et al, 1998).

Une étude publiée par Churchill et al (1999) a révélé que la souche CH1 de l'espèce de *Mycobacterium* isolée dans les dépôts d'Alaska est capable d'employer à l'état liquide les n-alcanes linéaires (dodécane et décahécane) et les n-alcanes à chaînes branchées (pristane), ainsi qu'à l'état solide des n-alcanes à longues chaînes (octadécane, docosane, octacosane) comme source unique de carbone et d'énergie à la croissance. Ce résultat a été confirmé par une autre étude menée par Yu et al (2000) qui ont isolé deux souches de *Mycobacterium* à partir des sols arctiques de Toundra canadienne. Il s'agit de la souche DhA-55 capable de se développer sur le dodécane et le pristane, et la souche IpA-13 capable de se développer sur l'octane et le pristane.

Des études récentes ont montré la possibilité de la dégradation des n - alcanes par deux microorganismes photosynthétiques *Microcoleus chthonoplastes* et *Phormidium corium* (isolés à partir des sédiments contaminés par pétrole brut). Il a été également démontré que les n - alcanes ont été oxydés en acides gras, ensuite incorporés aux lipides des cellules. Une étude réalisée sur la communauté microbienne habitant Wadi Gaza parmi eux les cyanobactéries a efficacement dégradé les deux composés aliphatiques (pristane et n - octadécane) (Abed et al, 2002).

### 1.2. Mécanismes d'attaque «Les oxygénases»

Selon le schéma standard, le catabolisme des n-alcanes commence par l'hydroxylation du carbone situé à une extrémité de la chaîne (oxydation terminale) qui correspond au bilan réactionnel d'une monooxygénase (Truffaut et al, 2001; Watkinson et Morgan, 1994):



Le système enzymatique impliqué est bien connu chez la souche *Pseudomonas oleovorans* qui sert de référence pour la dégradation des alcanes. Celui-ci comprend trois composantes : une hydroxylase membranaire (gène *alkB*) qui catalyse l'oxydation de la molécule, ainsi qu'une rubridoxine- $\text{Fe}^{2+}$  couplée à une rubrédoxine réductase qui assurent le transport d'électrons. Tous les gènes codant pour ces enzymes ont été entièrement séquencés. Contrairement à l'alcane hydroxylase de *Pseudomonas oleovorans* qui est une monooxygénase, une dioxygénase conduisant à un hydroperoxyde a été identifiée chez une espèce d'*Acinetobacter*. Plusieurs séquences nucléotidiques similaires au gène *alkB* ont par ailleurs été obtenues récemment chez diverses espèces de microorganismes, y compris à Gram positif. Ces travaux révèlent la diversité relativement importante de ces gènes, dont certains présentent peu de similarité avec le gène initialement connu chez *Pseudomonas oleovorans*. (Truffaut et al, 2001). Les travaux menés par Margesin et al (2003) concernant la caractérisation de la population microbienne dégradant les hydrocarbures dans les sols alpestres contaminés indiquent la prédominance de sept génotypes responsables de dégradation des hydrocarbures, parmi eux quatre impliqués dans la dégradation des n - alcanes (*Pseudomonas putida* Gpo1 *alkB* ; *Acinéto*bactérie spp. *AlkM* ; *Rhodococcus* spp. *alkB1* et *Rhodococcus* spp *alkB2* ).

Le système d'hydroxylation des eucaryotes, a été étudié notamment chez la levure *Candida tropicalis*. L'hydroxylase est un cytochrome P-450 qui reçoit les électrons du NADPH par l'intermédiaire d'une réductase flavoprotéique. Les hydroxylases du type cytochrome P-450 sont caractéristiques des organismes eucaryotes mais ont été observées par quelques systèmes bactériens tels que l'octane hydroxylase de *Cornybacterium 7 E 1 C* (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

### 1.3. Voie de dégradation

La figure III.1 présente une synthèse des voies métaboliques impliquées dans la dégradation des alcanes linéaires et branchés. La séquence de base après l'hydroxylation

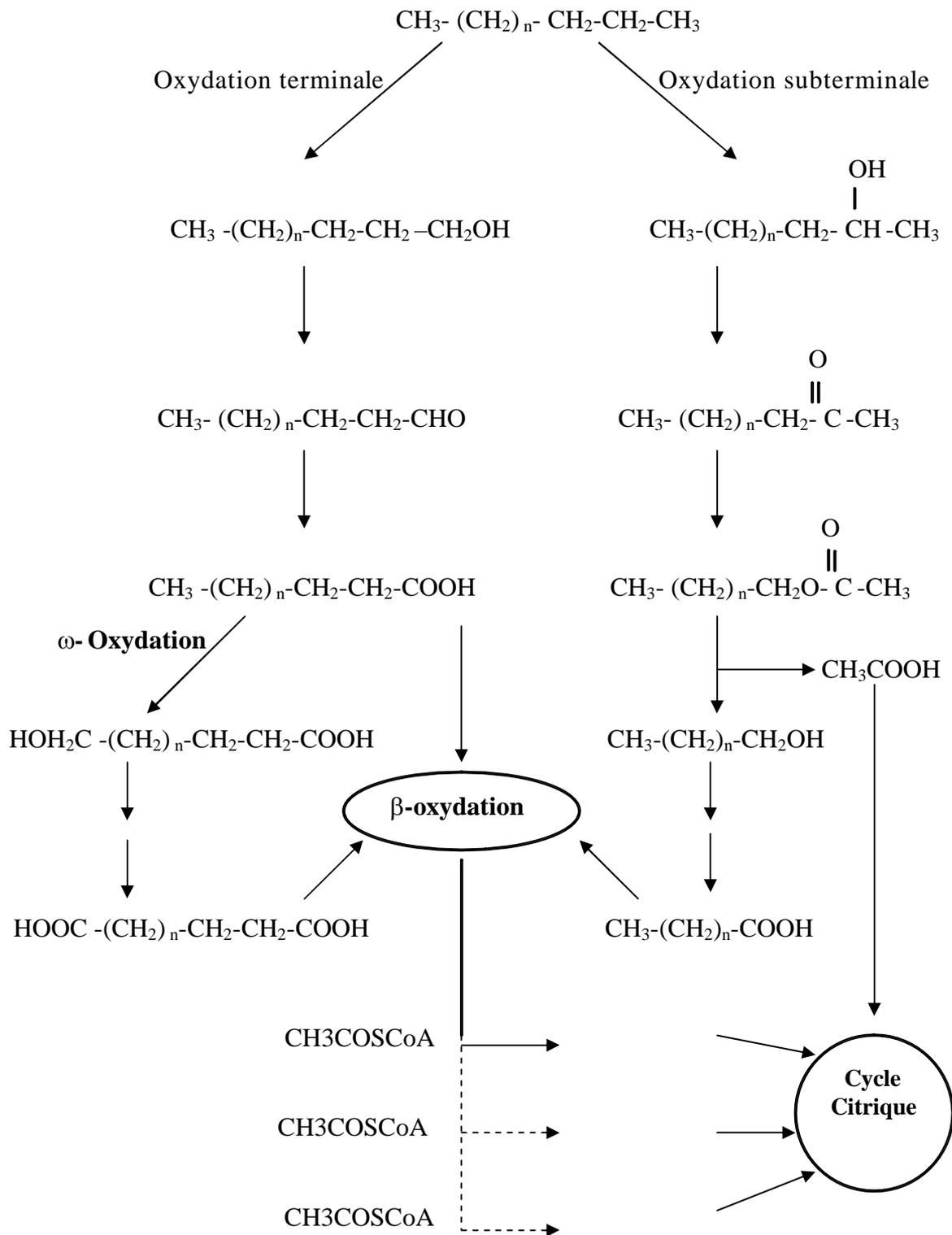


Figure III.1: Schéma général des voies métaboliques de dégradation des n-alcane et des isoalcanes (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

terminale de l'alcane consiste en une suite de déshydrogénation, impliquant souvent des enzymes NAD (P) dépendantes, en aldéhyde et acide. Le dérivé acyl coenzyme A (acyl CoA) est ensuite métabolisé par le système classique de  $\beta$ -oxydation soit directement ou, dans certains cas, après avoir subi à nouveau la séquence d'oxydation terminale à l'autre bout de la chaîne ( $\omega$ -oxydation). L'oxydation subterminale peut également avoir lieu, l'hydroxylation initiale se faisant alors sur l'avant-dernier carbone ou même plus loin dans la chaîne (Watkinson et Morgan, 1990). L'ensemble de ces voies a été démontré lors de la dégradation des n-alcane mais il est possible que l' $\omega$ -oxydation et l'oxydation subterminale concernent plus les alcanes branchés. Certains souches de *Rhodococcus* possèdent les deux voies métabolique pour la dégradation des alcanes de  $C_2$  à  $C_8$ , c'est l'exemple de *Rhodococcus rhodochrous* PNKb1 tandis que la souche BPM 1613 d'espèce *Rhodococcus* sp catabolise le pristane par l'oxydation terminale, suivi de  $\omega$  oxydation. D' autre part, *Rhodococcus erythropolis* atcc 4277 apparaît pour dégrader les alcanes ( $C_5$  à  $C_{16}$ ) seulement par la subterminale (Ballerini et Vandecasteele, 1999 ; Whyte et al, 1998).

Les résultats obtenus par Koike et al (1999) suggèrent qu'une nouvelle voie oxydante impliquant l'étape de la cis-désaturation puisse être impliquée dans la dégradation des alcanes par *Rhodococcus*. Comme étape initiale dans l'utilisation des alcanes, un coenzyme A cis-désaturation interne indépendante peut être impliquée, où un métabolite insaturé produit serait alors scindé au niveau de la double liaison en deux chaîne plus courte d'acide gras dicarboxylique, par la suite seront oxydées par la  $\beta$ -oxydation. Cette voie postulée est bien différente de l'oxydation subterminale.

En ce qui concerne les alcènes, le cas des doubles liaisons terminales a été étudié. Ces alcènes sont biodégradables et leur métabolisme rejoint celui des alcanes. Plusieurs modes d'attaques ont été mis en évidence mais l'oxydation du groupement méthyle terminal est considérée comme le mécanisme majeur.

Les cycloalcanes comme on l'a vu, constituent une autre classe d'hydrocarbures. Les structures alicycliques sont fréquentes dans les composés naturels ( $\alpha$ -pinène, camphre) et la dégradation de ces composés a été bien étudiée (Trudgill, 1990). En ce qui concerne les hydrocarbures pétroliers, les voies de dégradation examinées dans le cas du cyclohexane et de ses dérivés conduisent aux conclusions résumées ci-dessous. La dégradation du cyclohexane nécessite une première étape d'hydroxylation du noyau qui permet la dégradation selon le schéma présenté dans la figure III.2. Plusieurs auteurs s'accordent pour constater que l'on

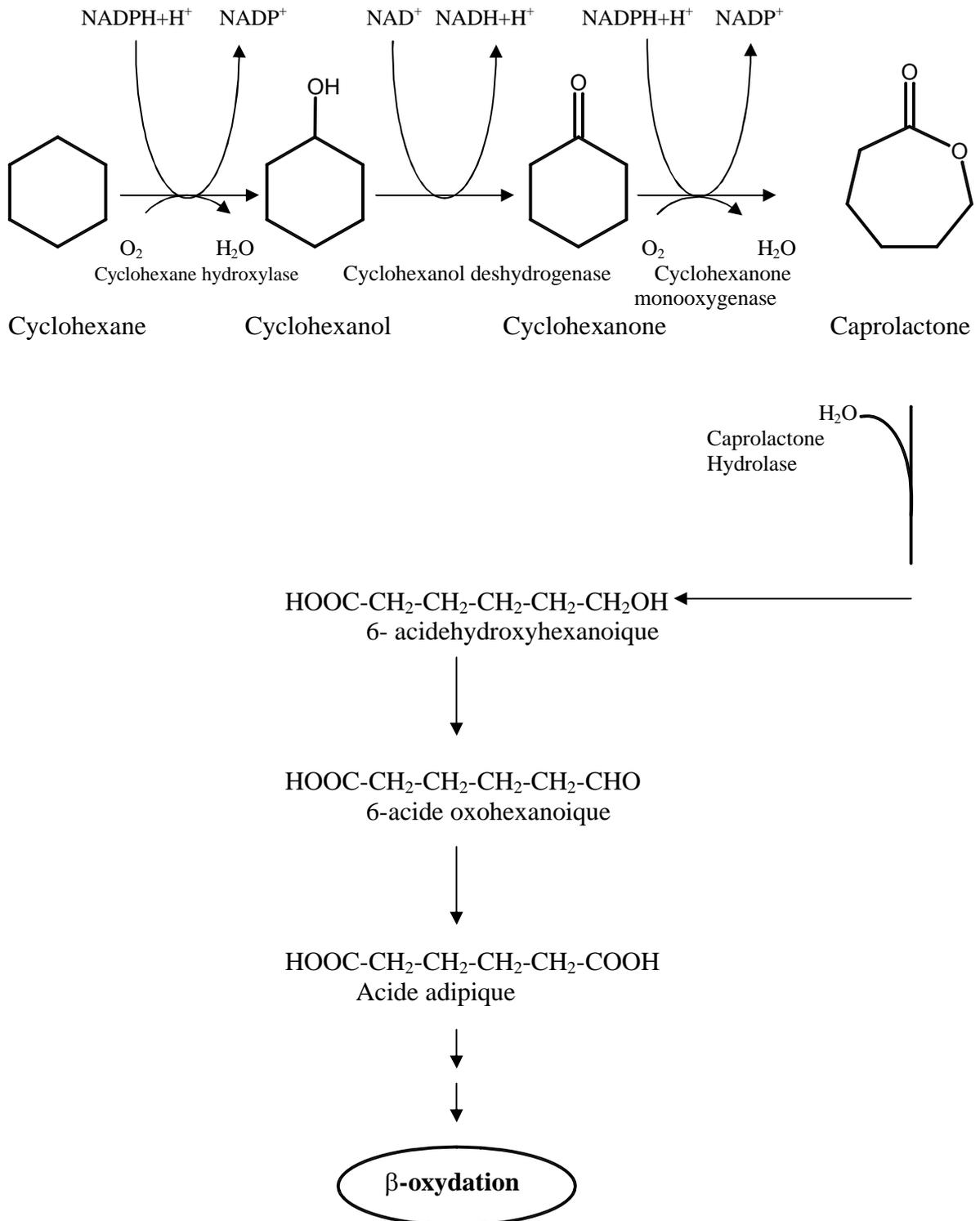


Figure III.2: Voie métabolique de la dégradation du cyclohexane (Atlas et Bartha, 1993 ; Morgan et Watkinson, 1994).

n'isole pas de souches pures utilisant le cyclohexane comme seule source de carbone et d'énergie mais de cultures mixtes. Certaines impliquent des relations de cométabolisme ou de mutualisme. Des souches cultivables sur cyclohexanol ou cyclohexanone sont en revanche facilement isolées. Le point remarquable dans la voie de la dégradation suivie est l'étape d'oxygénation du cycle pour former l' $\omega$ -caprolactone. La monooxygénase impliquée, une simple flavoprotéine à FAD a été caractérisée chez *Acinetobacter* et *Pseudomonas*.

D'autres voies de dégradation des composés alicycliques ont été démontrées, dépendantes de la nature des substituants du cycle. Un cas important est celui des alkylcyclanes. Les n-alkylcycloalcanes à nombre impair de carbones dans la chaîne latérale sont facilement dégradés, après l'hydroxylation terminale initiale de la chaîne, par la  $\beta$ -oxydation qui englobe la dégradation du cycle. Dans le cas des chaînes à nombre pair de carbone, la  $\beta$ -oxydation est bloquée au niveau du cycle. Seule des bactéries spécialisées plus rares peuvent à ce niveau libérer la cyclohexanone qui peut alors être dégradée comme préalablement mentionné (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

### 1.4. Croissance

Les cinétiques de croissance sur n-alcanes à longue chaîne ont été étudiées en détail mais ces cinétiques sont complexes du fait du mode de transfert. Une valeur caractéristique est celle du taux de croissance ( $\mu$ ) observé en culture continue qui est de  $0.25\text{h}^{-1}$  pour la levure *Candida tropicalis* utilisée pour la production de protéines unicellulaires. La croissance sur n-alcanes est très énergétique. Elle impose des transferts d'oxygène et de chaleur importants et permet des rendements massiques de production (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

### 1.5. Métabolisme anaérobie

Les capacités de micro-organismes pour dégrader des hydrocarbures dans des conditions strictement anaérobies sont très limitées. Elles sont pratiquement absentes pour des composés aliphatiques, mais cela n'empêche pas qu'il existe des exceptions extrêmement rares (Chayabutra et Ju, 2000). C'est le cas d'une étude réalisée par Holiger et Zehnder (1996) qui ont établi une description crédible de la dégradation et de la minéralisation de l'hexadécane et du dodécane par une bactérie sulfato-réductrice, dont le bilan global correspond à l'équation suivante :



Ce phénomène lent apparaît actuellement comme assez inhabituel (Ballerini et Vandecasteele, 1999)

### 2. Dégradation des hydrocarbures aromatiques :

En aérobiose, la plupart des voies cataboliques hydrocarbures aromatiques convergent vers des intermédiaires hydroxylés tels que les catéchols ou leurs dérivés (protocatéchuate, gentisate). Les enzymes qui catalysent ces transformations sont des monooxygénases et des dioxygénases. D'autres dioxygénases agissent ensuite pour réaliser l'ouverture du cycle aromatique de ces intermédiaires selon un clivage en position ortho ou méta. Ainsi, les enzymes de dioxygénase impliquées dans le catabolisme des hydrocarbures aromatiques par des microorganismes de sol illustrent bien la nature, la capacité de s'adapter à différentes sources de carbone (Mesarch et al, 2000; Truffaut et al, 2001; Sakamoto et al, 2001).

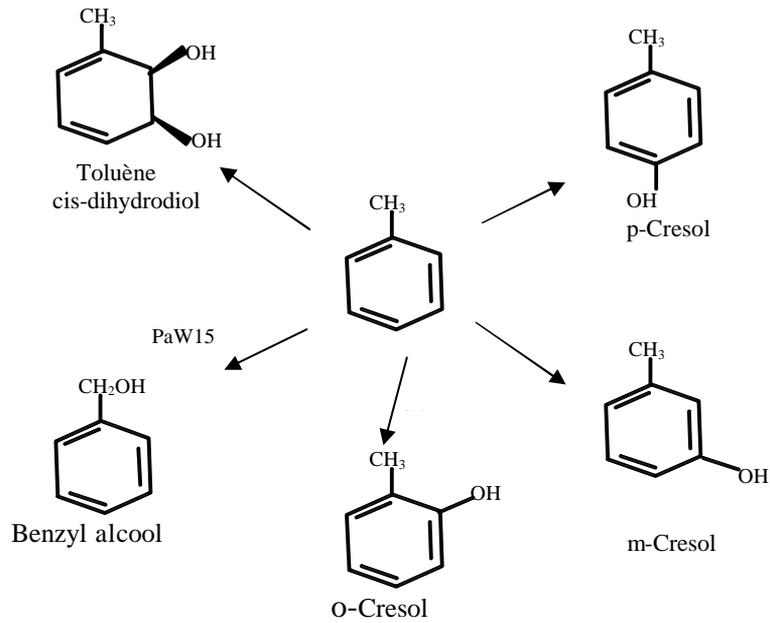
#### 2.1. Dégradation aérobie des hydrocarbures monoaromatiques :

##### 2.1.1. Micro-organismes :

La dégradation des hydrocarbures monoaromatiques est essentiellement le fait de bactéries gram-négatives, surtout les espèces de *Pseudomonas* (*Pseudomonas putida* 01G3, *Pseudomonas putida* PaW1, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas mendocina* KR1, *Burkholderia cepacia* G4, *Ralstonia pickettii* PKO1) et gram-positives du groupe CMN (Hanson et al, 1999; Ballerini et Vandecasteele, 1999; Parales et al, 2000; Chablain et al, 2001; Suenaga et al, 2001). Quelques cas de dégradation fongique ont été rapportés c'est le cas du deutromycète *Cladophialophora* sp(=ATCC MYA-2335) isolée à partir du sol contaminé par le BTEX, possède la capacité de croître sur un mélange complexe des hydrocarbures de BTEX comme source unique de carbone et d'énergie et le processus du catabolisme est semblable dans beaucoup d'aspects à celui des bactéries (Prenafeta-Boldu et al, 2003).

##### 2.1.2. Voies de dégradation :

Le mode d'attaque dépend des groupements alkyles substituant mais pour un même composé dépend également de la souche bactérienne. Cinq voies distinctes ont été décrites pour la dégradation aérobie du toluène, toutes les voies sont lancées avec l'oxydation du toluène mais cinq produits différents d'oxydation sont formés (Figure III.3). Le mode d'attaque très utilisé par une dioxygénase sur le noyau aromatique est la voie de dihydrodiol, la figure III.4 illustre



PpF1 (*Pseudomonas putida* F1), PaW15 (*Pseudomonas putida* PaW1), G4 (*Burkholderia cepacia* G4), PKO1 (*Ralstonia picketti* PKO1), KR1 (*Pseudomonas mendocina* KR1).

Figure III.3 : Les différents produits issus de l'oxydation du toluène (Parales et al, 2000).

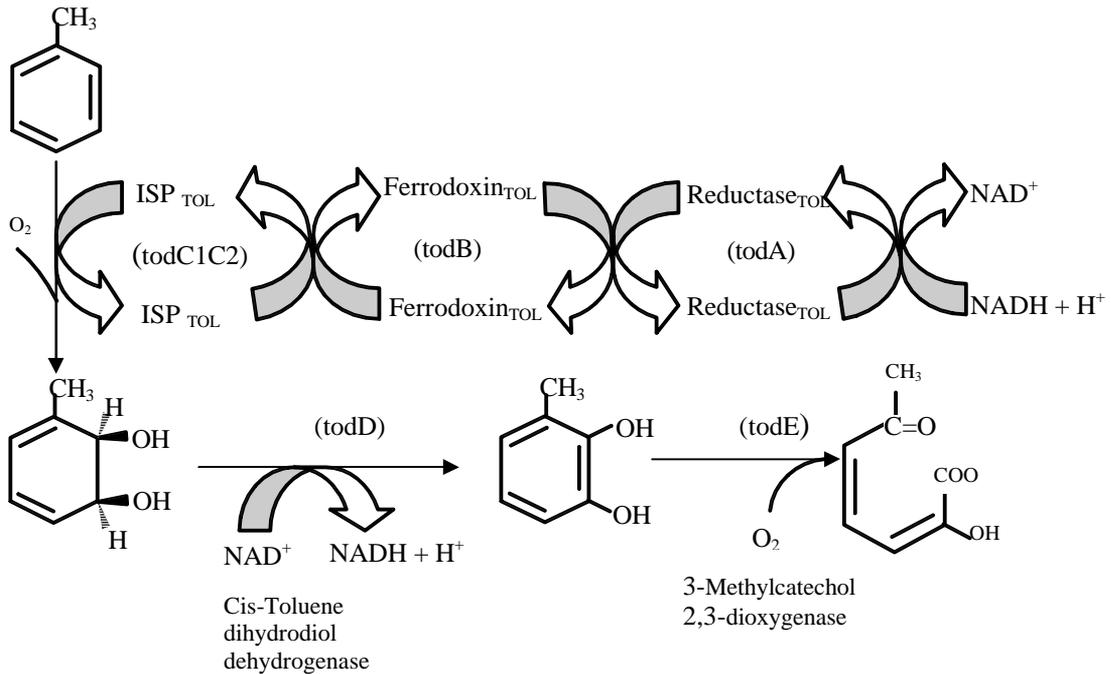


Figure III.4 : La voie de l'oxydation du toluène (Zylstra et Gibson, 1989; Sakamoto et al, 2001).

cette voie avec la molécule du toluène. Le toluène est d'abord oxydé en toluène cis-dihydrodiol par addition de l'O<sub>2</sub> au noyau aromatique, cette première réaction est effectuée par un système enzymatique désigné par le toluène dioxygénase. Ce système enzymatique a été déterminé chez *Pseudomonas putida* F1 (présente des analogies avec le système bactérien d'hydroxylation des alcanes déjà décrits). Il comprend trois composantes: réductase<sub>TOL</sub> (todA), ferridoxine<sub>TOL</sub> (todB), et les deux sous unité de la terminal dioxygénase « ISP<sub>TOL</sub> » (todC1C2). Le toluène dioxygénase a pour fonction de transférer des électrons du NADH au ISP<sub>TOL</sub>. Une règle générale est que les voies suivies aboutissent toujours à la formation des composés du cycle citrique et la présence des deux groupements hydroxyles sur le cycle aromatique est nécessaire pour l'ouverture du cycle. Leur disposition doit être en ortho (cas du catéchol) ou en para (l'acide gentisique) (Zylstra et Gibson, 1989; Ballerini et Vandecasteele, 1999; Parales et al, 2000).

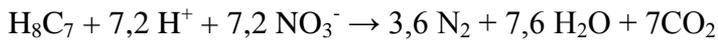
Les voies de dégradations des BTEX sont les mieux connues (voies Xyl, Tod, Tom/Ttb2m, Tbu, Tmo) ainsi que leurs gènes (toluène dioxygénase « tod », toluène monooxygénase « xyl », xylène monooxygénase « tol », ring hydroxylating toluène monooxygénase « tbu, tmo » ont été tous identifiés et bien caractérisés, notamment ceux de la voie Xyl, impliqués dans la dégradation du toluène et des meta- et para xylènes. Les gènes xyl sont souvent portés par des plasmides dits « plasmides TOL » chez des souches des genres *Pseudomonas* ou *Alcaligenes*, ils ont été analysés et séquencés dans le cas du plasmide TOL présent chez la souche *Pseudomonas putida* mt-2 (Truffaut et al, 2001; Baldwin et al, 2003).

### 2.1.3. Croissance :

Les BTEX constituent d'excellents substrats de croissance, très rapidement minéralisés par les bactéries, même si l'*o*-xylène est dégradé plus lentement que les autres et exceptionnellement par des souches pures. Les autres composés monoaromatiques plus substitués de l'essence sont également dégradés. Un problème posé, cependant, est celui de la toxicité de ces composés. Les doses toxiques variables selon les bactéries (dont certaines sont particulièrement résistantes) sont d'autant plus facilement atteintes que la solubilité de ces hydrocarbures est significative, d'où l'utilisation dans certains cas de techniques de limitation en substrat. Les microflores sous forme de biofilms, utilisées dans les procédés d'épuration en biofiltre, sont peu sensibles à ces effets d'inhibitions comparées aux bactéries libres (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

### 2.1.4 Dégradation anaérobie des hydrocarbures monoaromatiques :

La dégradation anaérobie des hydrocarbures aromatiques a été plus récemment mise en évidence. C'est surtout dans les conditions dénitrifiantes que la dégradation des BTEX a été observée dans l'ordre toluène, p-et m-xylène, éthylbenzène et o-xylène (le cas du benzène sera évoqué plus loin). Le bilan correspond à une minéralisation de l'hydrocarbure :



La dénitrification apparaît comme le système le plus efficace mais d'autres accepteurs d'électrons fonctionnant à des potentiels plus bas peuvent également dégrader certains hydrocarbures monoaromatiques. C'est le cas pour les bactéries sulfato-réductrices, des bactéries utilisant  $\text{Fe}^{3+}$  et enfin des consortiums dans les conditions méthanogène peuvent minéraliser le toluène (production de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{CH}_4$ ).

Concernant le benzène, des résultats positifs, d'autres négatifs, ont été rapportés avec divers accepteurs d'électrons. Il apparaît que le benzène est dégradé dans certains milieux possédant les microflore adéquates mettant en œuvre la réduction des sulfates ou de  $\text{Fe}^{2+}$  ou la méthanogenèse.

Les voies métaboliques de dégradation anaérobie sont encore mal connues mais elles sont supposées analogues à celles des composés comme le benzoate (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

### 2.2. Dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux, dont certains effets toxiques sont fortement cancérogènes, génotoxiques, immunotoxique, mutagénique ou tératogénique et donc une menace pour la santé publique (Heitkamp et al, 1987; Boldrin et al, 1993; Langworthy et al, 1998; Kastner et al, 1998; Bastiaens et al, 2000; Kanaly et Harayama, 2000; Wang et al, 2000; Rehmann et al, 2001; Cheung et Kinkle, 2001; Alexander et al, 2002; Kanaly et al, 2002; Eriksson et al, 2003). Quelques HAP sont classifiés comme polluants prioritaires par la plupart des agences de protection de l'environnement et en particulier celle des Etats-Unis en raison de leur persistance dans l'environnement (Kanaly et al, 2000; Kanaly et Harayama, 2000; Wang et al, 2000; Kanaly et al, 2002; Eriksson et al, 2003). Bien que les HAP puissent subir l'oxydation chimique, la photodécomposition et la volatilisation, la dégradation microbienne

est le processus principal affectant la persistance des HAP dans l'environnement (Potin et al, 2004b).

### 2.2.1. Micro-organismes :

Plusieurs espèces des algues, des bactéries et des champignons sont connues pour la dégradation des HAP. Généralement, ces micro-organismes sont isolés dans les sols et les dépôts contaminés, mais leur rôle au sein de la communauté microbienne n'est pas bien connu (Stapleton et al, 1998; Langworthy et al, 1998). Une étude a montré qu'il y a une synergie entre les mycètes et les bactéries pour la minéralisation des hydrocarbures aromatiques dans des environnements très hostiles tel un sol acide (Stapleton et al, 1998). La dégradation des HAP par les différents microorganismes a fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques.

#### ❖ *Dégradation par les bactéries :*

On a observé que la dégradation des HAP dans le sol est dominée par des souches bactériennes appartenant à un nombre très limité de groupes taxonomiques tels que *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* et *Mycobactérie* y compris des membres du genres *Acidovorax*, *Bordetella*, *Bacillus* et *Variovorax* (Kastner et al, 1998; Bastiaens et al, 2000; Annweiler et al, 2000; Kazunga et al, 2000; Kanaly et al, 2000; Samanta et al, 2002 ; Eriksson et al, 2003; Johnsen et al, 2005 ; Yu et al, 2005).

Parmi ces groupes taxonomiques les isolats appartenant aux sphingomonadaceae occupent la proportion la plus élevée, qui récemment ont été classés dans les genres suivant : *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* et *Sphingopyxis*. Les membres de ces genres apparaissent être spécialisés dans la dégradation des produits chimiques aromatiques et certains sont même considérés comme des oligotrophes strictes (Johnsen et al, 2005).

En revanche, la majorité des travaux c'est intéressé aux espèces de *Mycobactéries* en raison de leurs capacités de dégrader les HAP soit par cométabolisme soit par minéralisation. La plupart des voies biochimiques des *Mycobactéries* et leurs métabolites ont été identifiées (Boldrin et al, 1993; Schneider et al, 1996; Kanaly et Harayama, 2000; Cheung et Kinkle, 2001; Khan et al, 2001 ; Moody et al, 2001; Rehmann et al, 2001; Vila et al, 2001; Bogan et Sullivan, 2003).

D'autres espèces telles que *Cycloclasticus spirillensus*, *Lutibacterium anuloderans* et *Cycloclasticus* spp provenant des milieux marins ont montré leur potentiel de dégrader les

HAP (Geiselbrecht et al, 1998; Chung et King, 2001).

Les voies de dégradation des HAP ont été caractérisées sur la base des structures des intermédiaires de dégradation identifiés. Le schéma général est comparable à celui des hydrocarbures monoaromatiques. Après la double hydroxylation du premier noyau, une étape d'oxygénation supplémentaire est nécessaire pour chaque ouverture du cycle (Ballerini et Vandecasteele, 1999). Les gènes impliqués dans le métabolisme et la régulation des HAP ont été décrits pour des espèces de *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (Menn et al, 1993; Sanseverino et al, 1993; Wang et al, 2000; Moody et al, 2001; Ferrero et al, 2002).

### ❖ *Dégradation par les champignons :*

Contrairement aux bactéries, les champignons généralement n'utilisent pas les HAP comme leur source unique de carbone et d'énergie mais transforment ces composés aux métabolites détoxifiés par cométabolisme (Boonchan et al, 2000). Parmi les voies d'attaque des HAP chez les champignons, il faut distinguer celles existant chez les champignons lignolytiques de celles existant chez les autres champignons. Cette différence a fait l'objet de nombreuses études. Deux cas sont à considérer (Bouchez, 1995 ; Ballerini et Vandecasteele, 1999).

#### a) Cas des champignons non lignolytiques :

Les champignons non lignolytiques tels : *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium janthinellum*, *Syncephalastrum* s p e t *Saccharomyces cerevisiae* peuvent transformer une variété de HAP, y compris le pyrène, chrysène, et benzo[a]pyrène en métabolites polaires. Une étude a montré la capacité de la souche *Aspergillus niger* de transformer le pyrène et le phénanthrène en 1-méthoxypyrène et 1-méthoxyphénanthrène. L'attaque initiale des HAP est catalysée par une monooxygénase, par le biais de cette enzyme. Un atome d'une molécule d'oxygène est incorporé dans un cycle aromatique du HAP impliqué qui forme alors un arène oxyde qui peut évoluer en phénol ou en trans-dihydrodiol. L'autre atome de la molécule d'oxygène est réduit en eau. L'attaque initiale des HAP pouvant se faire en différentes positions, à partir d'un même HAP, de très nombreux isomères peuvent être formés. La monooxygénase responsable de cette dégradation est le cytochrome P-450 (enzyme membranaire inductible) (Bouchez, 1995; Sack et al, 1997; Boonchan et al, 2000; Garon et al, 2002; Potin et al, 2004a; Potin et al, 2004b).

### b) Cas des champignons lignolytiques :

Le mécanisme d'attaque des HAP est ici complètement différent des précédents. Lorsqu'ils sont cultivés en conditions limitantes en carbone, en azote ou en soufre, les champignons lignolytiques produisent des enzymes extracellulaires, y compris des lignines peroxydases [LiP] qui permettent l'attaque de la structure aromatique de la lignine et le manganèse peroxydases [MnP] qui sont présumées pour être impliquées dans le processus de dégradation des HAP. Il s'agit en fait de cométabolisme puisque les composés libérés ne peuvent pas servir de substrats de croissance aux champignons qui les produisent, les champignons de la pourriture blanche tels que *Phanaerochete chrysosporium*, *Trametes versicolor* et *Pleurotus ostreatus* sont les mieux étudiés et peuvent dégrader certains HAP et détoxifier les sols et les dépôts pollués par les HAP. Les lignines peroxydases sont peu spécifiques. Elles agissent sous forme oxydée en soustrayant un électron à la structure aromatique attaquée. Les HAP tels que l'anthracène, le pyrène, le benz (a)anthracène et le benzo (a)pyrène sont oxydés mais l'attaque reste très limitée. Des structures quinoniques (pyrène 1,6-dione dans le cas du pyrène) et des composés aromatiques hydroxylés sont obtenus. Dans la plupart des cas ces métabolites ne sont pas métabolisés plus loin.

L'intérêt suscité par ce mécanisme réside dans le fait qu'il met en jeu une enzyme libre extracellulaire et peut-être, selon certaines hypothèses encore à confirmer, susceptible d'un meilleur accès qu'une bactérie aux HAP polluants (Ballerini et Vandecasteele, 1999; Kastner et al, 1999; Boonchan et al, 2000; Canet et al, 2001; Garon et al, 2002; Potin et al, 2004a; Potin et al, 2004b).

### ❖ *Voies de dégradation chez les algues et les cyanobactéries :*

Des rapports récents ont montré que les microorganismes photosynthétiques, en particulier les cyanobactéries, peuvent jouer un rôle direct ou indirect dans le métabolisme et la dégradation des hydrocarbures. Les cyanobactéries comme *Anabaena cylindrica*, *Phormidium faveolarum* de *Oscillatoria* JCM et *Agmenellum quadruplicatum* peuvent dégrader différents composés aromatiques. Narro (1985) a démontré la capacité de *A. quadruplicatum* d'oxyder le phénanthrène en trans-9, 10-dihydroxy-9, 10-dihydrophénanthrène et 1-méthoxyphénanthrène avec le système de monooxygénase. Une autre étude réalisée par Narro et al (1992) a confirmé la formation de 1-méthoxyphénanthrène à partir du phénanthrène par *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 (Sack et al, 1997; Abed et al, 2002). Cependant, une recherche sur le génome de la souche *Synechocystis* PCC 6803 a indiqué que cette cyanobactérie possède les

gènes de dioxygénase, qui catalysent l'incorporation des deux atomes de la molécule d'oxygène dans noyau aromatique, produisant ainsi les dihydrodiols. Ceci laisse suggérer que ce cyanobacterium pourrait également avoir joué un rôle dans la dégradation aérobie des composés aromatiques comme le dibenzothiophène et phénanthrène (Abed et al, 2002).

Dans des systèmes de nappe, les cyanobactéries sont présentes en association avec les bactéries dégradant le pétrole brut et les empêchent de s'en aller par l'immobilisation dans leur mucilage. En outre, elles fournissent également aux bactéries l'oxygène produit par la photosynthèse et l'azote fixé requis pour leur activité dans le processus de dégradation. Ce rôle indirect de cyanobactérie peut être important pour le succès global du processus de la biodégradation (Abed et al, 2002).

### 2.2.2. Dégradation anaérobie des hydrocarbures aromatiques polycycliques :

La dégradation anaérobie des HAP a été démontrée dans plusieurs études de microcosme avec comme accepteurs final d'électron le nitrate, fer ferrique, Sulfate ou dans des conditions méthanogènes (Meckenstock et al, 2004). Les résultats obtenus par Chang et al (2002) prouvent que des bactéries sulfato-réductrices, méthanogènes, et les eubactéries sont impliqués dans la dégradation des HAP, mais les bactéries sulfato-réductrices occupent une part importante des consortiums adaptés aux HAP.

Les voies biochimiques de dégradation ont été étudiées avec des espèces dégradants le naphthalène soit en culture pures, soit en cultures enrichies. Ces voies convergent tous vers un métabolite principal qui est l'acide 2-naphthoïque. Ce dernier est obtenu soit par l'addition d'une molécule de dioxyde de carbone au naphthalène, soit par l'addition du fumarate au groupe méthyle du méthyl-naphthalène (Figure III.5).

La dégradation anaérobie des HAP a été également démontrée in situ dans des couches aquifères contaminées par identification des métabolites spécifiques (naphthyl-2-methylsuccinate, l'acide 2-naphthoïque). D'autres métabolites spécifiques tels que les acides carboxyliques ont été détectés dans les eaux souterraines, indiquant ainsi la dégradation anaérobie des HAP et des composés hétérocycliques (Meckenstock et al, 2004).

### 3. Dégradation des hydrocarbures chlorés (solvants chlorés):

Les solvants chlorés sont des hydrocarbures aliphatiques de bas poids moléculaire, partiellement ou totalement substitués par du chlore. Le trichloréthylène (TCE) est reconnu

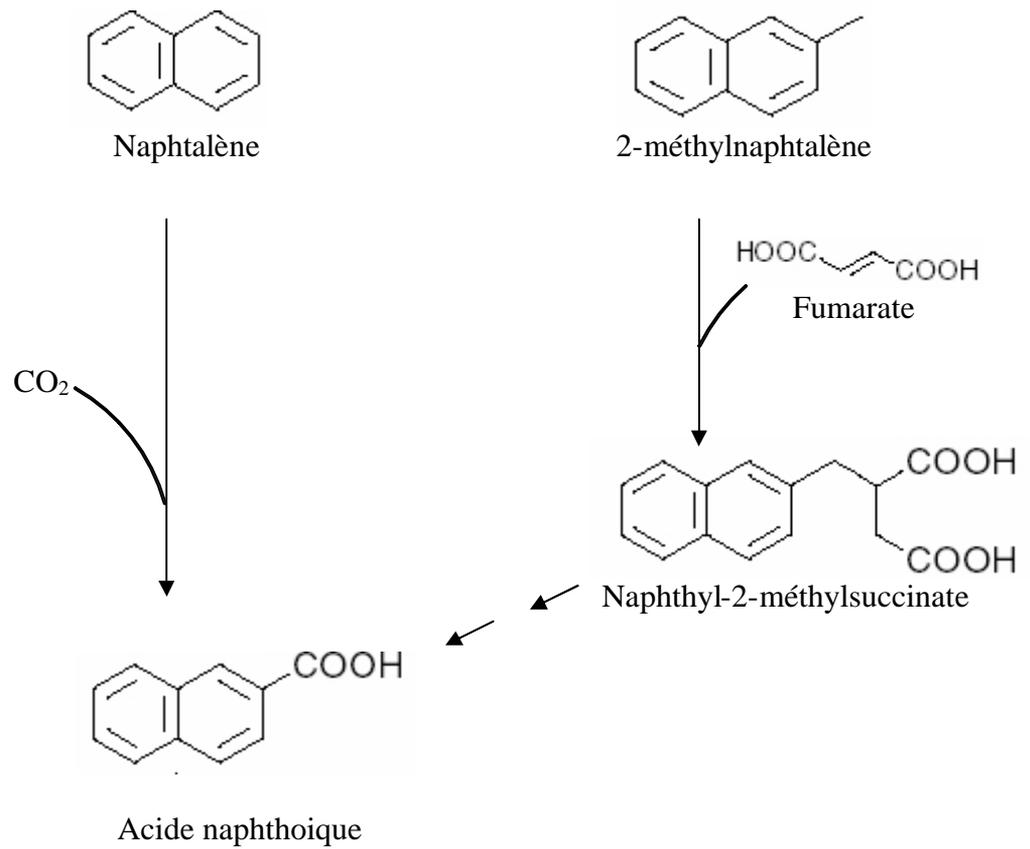


Figure III.5 : Production de l'acide naphthoïque par la dégradation anaérobie des HAP (Meckenstock et al, 2004).

pour être le polluant environnemental très répandu dans le monde industrialisé (40% des sites sont contaminés). Il est considéré comme un polluant prioritaire par l'agence de protection de l'environnement (suspecté pour être cancérigènes). En général, les solvants chlorés se sont des composés qui persistent avec le temps dans l'environnement pendant des décennies, quoiqu'ils puissent être métabolisés par les bactéries, soit en anaérobiose (déshalogénéation réductrice) soit en aérobie (oxydation cométabolique). Les processus de dégradation sont résumés ci-dessous (Doty et al, 2000 ; Parales et al, 2000 ; Vogel et Ballerini, 2001 ; Maeda et al, 2001) :

### 3.1. Dégradation aérobie :

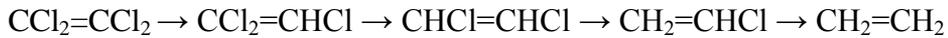
Certains solvants chlorés peuvent être utilisés comme substrats carbonés par des microorganismes aérobies. C'est le cas par exemple du dichlorométhane, du chlorure de vinyle, du 1,2-dichloroéthane et du chloroéthane. La biodégradation procède par une réaction de substitution d'un atome de chlore par un groupement hydroxyle. Toujours en aérobie, plusieurs solvants chlorés peuvent être dégradés par un processus de cométabolisme. C'est le cas du dichlorométhane, du chloroéthane, du chlorure de vinyle, du dichloroéthylène (DCE) et du trichloroéthylène (TCE). Les enzymes responsables de l'attaque primaire sont des monooxygénases et des dioxygénases telles la méthane monooxygénase (MMO), la toluène monooxygénases, ammonium monooxygénase, propane monooxygénase (PMO), phénol hydroxylase et la toluène dioxygénase qui sont induites en présence de substrats inducteurs cométaboliques. Ces derniers peuvent être le méthane (stimulation des microorganismes méthanotrophes), le propane, le propylène, le phénol, le toluène et l'ammoniaque. Généralement, ces enzymes sont d'autant plus efficaces que les solvants halogénés sont moins substitués. Les microorganismes aérobies capables d'effectuer ces types de réaction appartiennent aux genres *Pseudomonas* (*P.cepacia*, *P.mendocina* et *P.putida*), *Alcaligenes*, *Hypohomobim*, *Xanthobacter*, *Acinetobacter*, *Ancylobacter*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Fan et Scow, 1993 ; Doty et al, 2000 ; Vogel et Ballerini, 2001 ; Maeda et al, 2001).

Le mécanisme de dégradation du trichloroéthylène (TCE), solvant chloré type, est illustré dans la figure III.6 dans le cas de la MMO.

### 3.2. Dégradation anaérobie :

Les composés totalement substitués tels que le tétrachloroéthylène et le tétrachlorure de carbone ne peuvent être dégradés qu'en anaérobiose par des bactéries méthanogènes, sulfato-réductrices, dénitrifiantes ou acétogènes. Le mécanisme de biodégradation consiste en une déchloration réductrice se traduisant par la perte des substituants chlorés, remplacés par des atomes d'hydrogène. Pour la mise en œuvre d'un tel mécanisme, les bactéries ont besoin d'une source de carbone et d'électrons autre que le solvant chloré. Cela peut être, par exemple, le benzoate (Vogel et Ballerini, 2001).

Les déshalogénations successives du tétrachloroéthylène selon la séquence :



Les vitesses de dégradation obtenues en déshalogénations réductrices sont plus faibles qu'en cooxydation (Ballerini et Vandecasteele, 1999).

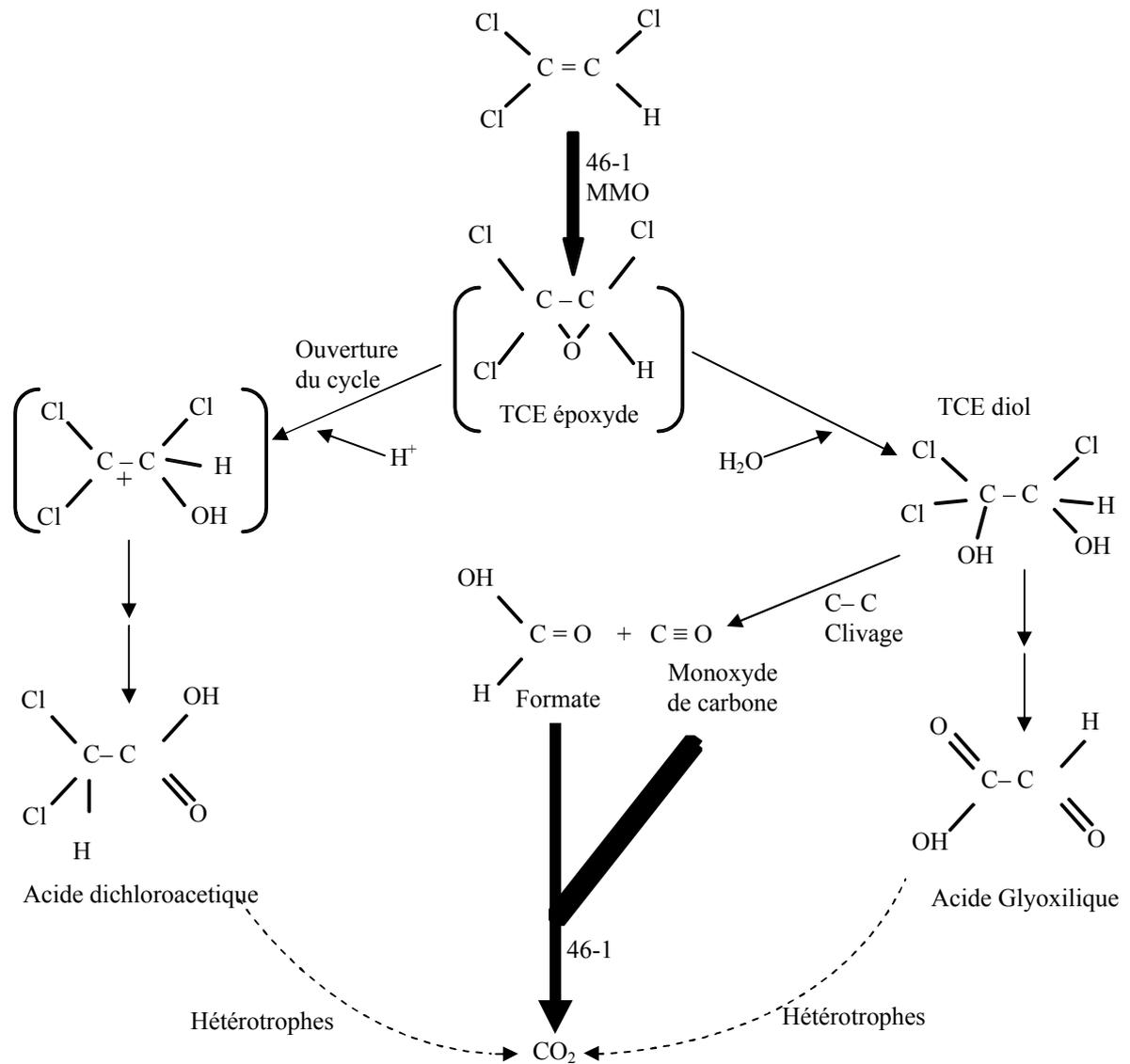


Figure III.6 : Le mécanisme de dégradation du trichloréthylène (TCE) par une bactérie méthanotrophe (la souche 46-1) (Little et al, 1988).

## CHAPITRE IV

### Problématique de la restauration des sols contaminés

Ces dernières années, la restauration des sols contaminés par les hydrocarbures, les solvants, et d'autres produits organiques de même nature, a pris une importance majeure. De nombreux sites industriels et municipaux devront être restaurés pour des raisons de déclassement, de transactions immobilières, de protection des eaux souterraines, ou de déversements ou de fuites de produits chimiques (<http://strategis.ic.gc.ca/>).

La pollution pétrolière est en relation avec le transport, le stockage et la distribution de carburant et de fioul qui représente les plus gros volumes de produits organiques utilisés, ainsi que de solvants tels que des composés organohalogénés.

Sous le terme de pollutions accidentelles sont regroupées des pollutions d'origines différentes, les unes brutales et massives, suite par exemple à des accidents, les autres résultantes de fuites, souvent à faible débit, sur des cuves ou canalisations, pouvant être d'origine relativement ancienne (Vogel et Ballerini, 2001).

#### I- PROCESSUS D'ALTERATION DES HYDROCARBURES REPANDUS :

La composition chimique des hydrocarbures change suite à leur altération. L'altération se produit par évaporation, dégradation microbienne, oxydation chimique et réactions photochimiques. Certains hydrocarbures s'altèrent rapidement et subissent des changements profonds de nature, tandis que d'autres demeurent relativement stables pendant longtemps. Pour les hydrocarbures dont la masse moléculaire est peu élevée, les effets de l'altération sont généralement rapides (1 à 2 jours) à cause de l'évaporation (Russell, 1999).

L'altération des hydrocarbures dont la masse moléculaire est plus élevée est plus lente et a pour principale cause la dégradation microbienne et l'oxydation chimique. L'altération ou le devenir du pétrole répandu dépend des propriétés des hydrocarbures et des conditions environnementales. Il est important de reconnaître la nature dynamique des déversements d'hydrocarbures et le fait que les propriétés des hydrocarbures déversés puissent éventuellement se modifier. Au cours d'opérations d'intervention, il est important de suivre de près les changements continus des propriétés des hydrocarbures déversés, car elles pourront déterminer les stratégies d'intervention en conséquence (Russell, 1999).

## II- LE COMPORTEMENT DES HYDROCARBURES DANS LE SOL

La pollution par les hydrocarbures forme une phase fluide distincte de l'eau ; une fraction est soluble et susceptible de passer dans les nappes ; dans la zone non saturée une autre fraction peut se trouver sous forme gazeuse. De plus, la densité du polluant par rapport à l'eau induira un comportement de pollution très différente selon qu'elle est inférieure ou supérieure à celle de l'eau.

Il s'agit donc d'un problème particulièrement complexe à traiter dans son ensemble. Une telle pollution conduit en effet à un mélange de phases (eau, huile, air, vapeur) et à un mélange de plusieurs composants carbonés avec leurs propres caractéristiques physiques (densité, viscosité...). Chaque phase en déplacement (avec passage possible d'une à l'autre) véhicule plusieurs composants, susceptibles de passer d'une phase à l'autre (par dissolution, vaporisation, condensation), y compris d'interagir avec la phase solide (adsorption-désorption) (Lemière et al, 2001).

### II.1- Cas des hydrocarbures plus légers que l'eau

La quantité déversée doit être suffisante pour qu'il y ait formation d'une phase continue. Sinon, la pollution se manifestera sous la forme de gouttelettes d'huile piégées dans les pores constituant autant de micro sources de pollution, par relâchement dans la phase eau de composants solubles. S'il y a constitution d'une phase huileuse non miscible et continue, celle-ci va migrer vers la nappe sous l'influence de la gravité et des forces capillaires, ces dernières induisant de plus un étalement latéral.

La phase huileuse en déplacement peut être enveloppée d'une phase gazeuse formée par la vaporisation des composants les plus volatils.

Si la nappe est atteinte, les composants solubles passeront dans la phase eau et seront entraînés. La quantité de polluant restant à l'état de phase distincte de se déplacer lentement sous l'effet de ses propres gradients de pression en exerçant sur la nappe une action qui en déprimera légèrement la surface. Cette fraction du polluant au-dessus de la nappe (le corps d'imprégnation) représente une source de pollution durable pour la nappe (Lemière et al, 2001).

## II.2- Cas des polluants plus lourds que l'eau

Leur migration jusqu'à la nappe peut être très rapide, surtout si la teneur en eau de la zone non saturée est faible. Une fois dans la nappe, ils continuent à migrer vers le bas jusqu'à ce qu'ils aient atteint soit le substratum soit une intercalation peu perméable. Ils peuvent alors rester piégés dans les irrégularités du substratum ou bien migrer dans le sens du pendage de celui-ci, éventuellement dans le sens contraire de la direction générale de l'écoulement de la nappe (Lemière et al, 2001).

## III- NORMES ET REGLEMENTATION EN MATIERE DE PROTECTION DES SOLS :

En Algérie les grands principes qui régissent la réglementation en matière de protection du sol et du sous-sol sont formulés par les textes suivants :

- La loi n°83-03 du 05/02/1993, prend en considération la pollution du sol. Le législateur définit les déchets et pose les principes et les règles générales de leur gestion.

Concernant cette dernière, la loi fait obligation à tout détenteur ou producteur de déchets d'assurer ou de faire assurer leur élimination en évitant seulement, et non en supprimant, les effets néfastes sur le sol, la faune, la flore, etc...

- Le décret exécutif n°93-160 du 10/07/1993, régleme le déversement des huiles et lubrifiants aussi bien dans le milieu naturel que dans le réseau d'assainissement.
- Le décret exécutif n°93-162 du 10/07/1993, fixe les modalités de récupération et de traitement des huiles usagées.
- Le décret exécutif n°94-43 du 30/01/1994, fixe les règles de conservation des gisements d'hydrocarbures et de protection des aquifères.

L'Algérie a fixé des normes de rejets des eaux industrielles et en particulier des huiles, mais jusqu'à présent les normes et les seuils de contamination des sols et des eaux souterraines n'ont pas été établis. (Voir le tableau IV.1) (Ait Ali, 1998).

Parmi les normes fixées qui définissent pour chaque polluant une valeur seuil facilitant les prises de décision et permettant de dire qu'un sol doit être dépollué ou non, sont celles établies par la Hollande représentés par le tableau IV.2.

Tableau IV.1: Valeurs limites maximales des paramètres de rejets des installations de déversement en Algérie (J.O.R.A, 1993)

Paramètres	Valeurs maximales
Huiles et graisses	20 mg/l
Hydrocarbures	20 mg/l
Phénols	0.5 mg/l
Solvant organique	20 mg/l
Chlore actif	0.1 mg/l
PCB	0.001 mg/l
Détergents	0.2 mg/l
Tensioactifs anioniques	10 mg/l

Tableau IV.2 : Normes hollandaises de qualité des sols (Gatelier, 1992).

mg/Kg de matière sèche	<b>A</b> Seuil de référence	<b>B</b> Seuil de risque	<b>C</b> Seuil de danger
<b>COMPOSES AROMATIQUES</b>			
Benzène	0.01	0.5	5
Ethylbenzène	0.05	5	50
Toluène	0.05	3	30
Xylène	0.05	5	50
Phénol	0.02	1	10
Total composés aromatiques	0.1	7	70
<b>HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES (HAP)</b>			
Naphtalène	0.01	5	50
Anthracène	0.1	10	100
Phénanthrène	0.1	10	100
Fluoranthène	0.1	10	100
Pyrène	0.1	10	100
Benzo(a)pyrène	0.05	1	10
Total HAP	1	20	200

Le problème posé par de telles normes est qu'elles ne tiennent pas compte de :

- L'État du sol avant pollution (les bruits de fond géochimiques) ;
- L'utilisation ultérieure du sol ;
- La vulnérabilité du site (la proximité d'une nappe phréatique),

Les avantages de l'approche hollandaise sont :

- La simplicité d'emploi tant pour le diagnostic que pour les objectifs de traitement ;
- Sa valeur exutoire lorsqu'elle est reconnue ;

Des valeurs normalisées basées sur une évaluation des risques ont également été mises en place aux USA. Dans ce cas, les normes prennent en considération les risques toxicologiques dus aux transferts de pollution et des modes d'absorption. Cette méthode est malheureusement longue et coûteuses et implique une modélisation complexe difficile, voire impossible à construire du fait de la multiplicité des paramètres (Gatelier, 1992).

### IV-LES TECHNIQUES DE DECONTAMINATION :

Les procédés de décontamination des sols peuvent être regroupés selon trois familles: les traitements hors site (les sols sont emmenés vers une installation extérieure), sur site et in situ (qui ne nécessitent pas une excavation des terres polluées).

De plus, on peut traiter les sites pollués de trois façons :

- en considérant la terre polluée comme un déchet qu'il faut excaver puis mettre en décharge ou incinérer,
- En utilisant des techniques de pompage, d'extraction sous vide, de confinement et de lavage : c'est l'approche des chimistes et des hydrogéologues,
- En employant les biotechnologies (bioremédiation...).

Ces différentes techniques sont très souvent combinées. D'où la nécessité d'essais préalables en laboratoire sur des échantillons ou avec des pilotes sur site, pour définir le mode de traitement le plus approprié (<http://www.pacac.cci.fr/ARIST/>).

Le choix d'une technique de décontamination s'appuie sur (<http://www.recy.net/modules/SSP/>):

- critères techniques : nature du polluant, conditions hydrogéologiques, etc.
- critères économiques : coût / bénéfice
- critères humains : impact et perception de la population.

Les principales techniques de décontamination (excavation, stabilisation...) que nous présentons ici sont résumées dans le tableau IV.3

#### IV.1- Traitements physiques

##### IV.1.1- L'excavation :

C'est une méthode très simple à mettre en œuvre, rapide et radicale. Elle pose néanmoins deux gros problèmes :

- Problèmes du transport et du stockage des terres excavées (sur site, hors site suivant la place disponible)

Tableau IV.3: Les différentes techniques de décontamination du sol pollué (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

Type	Méthode	Cible	Avantages	Inconvénients
Excavation	Excavation Mise en décharge	Matériaux solides	Simple, rapide, radicale	Transport, étendue pollution possible
	Pompage	Phase libre, pure dans la nappe	Très efficace si mise en oeuvre rapidement	Dispersion possible du polluant
	Venting	Produits volatiles, hydrocarbures légers	Traite des milieux peu favorables	Dispersion possible du polluant
<b>Piégeages</b>	confinement	Tout polluant	Radical	
	Stabilisation	Métaux lourds et solvants chlorés	Radical	
Chimiques	Lavage	Presque tous les polluants	Simple	Risque de dispersion
	Mobilisation	Presque tous types	Très simple	Gros risques de dispersion
	Réaction chimique	Produits organiques	Très efficace	Risque de repollution
<b>Thermiques</b>	Incinération hors-site	Tous les polluants	Radical	Risque de pollution Coût de l'opération
	Vitrification in situ	Tous les polluants	Très stable dans le temps	Encore expérimental
<b>Biologiques</b>	bio réacteur	Solides, eau, gaz	Simple	Excaver ou pomper
	Compostage landferming	Produits hydrocarbonés peu volatiles	Assez efficace	Rejets volatils et pollution possible
	Bio pile	Produits volatiles	Efficace	Long
	Champignons	Produits hydrocarbures	Efficace	Stade expérimental
	Bioventing, biosparting	Produits volatiles	Très efficace	Fortes contraintes pour le sol

- Il y a risque d'étendre la pollution.

Une fois les terres excavées, une des solutions habituellement proposées est de les envoyer vers un centre de traitement spécialisé ou vers un centre d'enfouissement technique. La filière devra être organisée avant le démarrage de l'excavation, et la solution retenue en fonction des différentes contraintes techniques doit être acceptée par tous les intervenants (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

#### IV.1.2- Le pompage de l'eau :

a-Le pompage :

Cette méthode peut être très longue car pendant le traitement de l'eau, la nappe phréatique peut être alimentée en polluants par l'intermédiaire du sol.

L'efficacité du pompage dépend des caractéristiques du milieu et du comportement du polluant :

- Il faut tenir compte entre autres des mouvements de l'eau pour choisir où implanter le pompage ;
- Il faut empêcher le polluant de se déplacer ou de se disperser : on implante le pompage plutôt au centre de la zone contaminée et plutôt vers l'aval (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

### b- Le pompage-écrémage :

Cette technique est basée sur le pompage sélectif d'un produit flottant. Elle s'applique sur les produits organiques en phase flottante au toit de la nappe, comme par exemple les hydrocarbures. Tous les produits plus lourds que l'eau ou trop solubles ne peuvent donc pas être traités. Seule une partie du surnageant est récupérée, limitée au mieux à 60% du produit parvenu à la nappe. Cette méthode est souvent couplée à un rabattement de nappe qui facilite l'écoulement du produit vers le point de captage.

Elle nécessite la mise en place de puits forés, un matériel classique de pompage est utilisé pour extraire le polluant. Une dépression est créée par une première pompe de rabattement placée au milieu de la zone d'accumulation. Le polluant est aspiré par une deuxième pompe d'écémage puis est traité en surface après être passé dans un séparateur eau/huile.

Cette technique ne s'emploie pas seule, elle est toujours couplée à des méthodes permettant de traiter le polluant restant qui représente en moyenne 50% de la quantité initiale contenue dans le sol (Colin, 2000).

### IV.1.3- Venting :

Le venting est un procédé d'extraction par le vide. La création d'une dépression d'air dans le sol à partir de puits verticaux ou horizontaux permet d'extraire les composés volatils. Le gradient de pression induit dans le sol provoque le passage en phase gazeuse des composés volatils présent en phase liquide ou adsorbés à la surface des particules de sol. Le flux d'air extrait est alors traité en surface, généralement par un filtre à charbon actif, avant rejet dans l'atmosphère.

Ce traitement est adapté à des produits polluants volatils tels que les solvants organiques notamment chlorés (trichloréthylène), les hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène...),

les hydrocarbures d'essences et quelques composés organiques (alcools, éthers). Ce procédé ne traite que la zone non saturée en eau (<http://www.enviro.lu/France/Depollution.html>).

### IV.1.4- Confinement :

Le confinement est une technique qui consiste à isoler la source de pollution pour empêcher la migration des substances polluantes. Elle est principalement utilisée pour les anciennes décharges ou d'anciens sites industriels couvrant une zone étendue. Il y a plusieurs méthodes de confinement :

- Le confinement en décharge
- La couverture par géomembranes
- Le confinement en parois moulées

Le confinement est surtout utilisée dans l'industrie nucléaire et pour traiter l'amiante. On a remarqué que les techniques de confinement et de stabilisation combinée donne de très bons résultats pour la décontamination des métaux lourds (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

### IV.1.5- Stabilisation :

On mélange le produit polluant à différents adjuvants pour en faire un matériau composite solide, peu perméable et non réactif.

Avantages: pas de risque de migration, peu de suivi dans le temps et peu onéreux.

La méthode la plus utilisée, ciment + eau + polluant. C'est une méthode dure et stable dans le temps. Cette technique joue le rôle triple :

- Réduire la solubilité du déchet ;
- Assurer la rétention des éléments polluants;
- Améliorer les caractéristiques mécaniques des déchets.

On distingue trois méthodes de stabilisation :

- La stabilisation par liants minéraux : ils'agit d'un procédé à froid qui incorpore le déchet avec le liant minéral, les additifs et l'eau. Il combine solidification et fixation ;
- La stabilisation par liants organiques : ils'agit d'un procédé d'enrobage qui consiste à enfermer dans une gangue étanche les terres polluées, les liants sont le bitumes et les thermoplastiques ;

- La vitrification : ils'agit d'une rétention physico-chimique des polluants d'un déchets dans une matrice vitreuse, obtenue par un traitement à haute température. Ce type de technique permet de piéger les polluants à l'intérieur d'une matrice, ils ne sont plus disponibles et leur potentiel de relargage dans le milieu naturel est neutralisé (Costes et Druelle, 1997 ; <http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

### IV.1.6- Lavage du sol :

L'opération consiste à injecter de l'eau directement dans le milieu, en amont de la pollution, et à la pomper en aval, chargée de polluant.

On peut remplacer l'eau chaude par de la vapeur lorsqu'on a affaire à des produits peu solubles, plus denses que l'eau.

Cette méthode doit toutefois être utilisée avec le plus grand soin. En effet, il faut faire très attention car elle comporte le risque de disperser la pollution et de l'entraîner rapidement vers l'aval en dehors de la zone de traitement prévue. Il y a ainsi deux précautions principales à prendre (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>) :

- il faut installer des piézomètres pour contrôler que la pollution ne sort pas de la zone
- il faut placer le puits de récupération pas trop loin du puits d'injection.

#### a- Le lavage ex-situ :

Ce lavage est utilisé dans le cas de fortes concentrations (de 50 000 ppm à 150 000 ppm en hydrocarbures, pesticides, cyanures et métaux). Son efficacité est de 80 à 99%. Cette voie est extrêmement large puisqu'elle englobe tous les types de lavage : à l'eau, seule ou avec des tensioactifs ou avec des solvants. D'une manière générale, cette technique ne s'applique que si le taux de particules fines n'est pas trop important.

#### b- Le lavage in-situ :

Le lavage in-situ est très efficace (50 à 80%) utilisé dans les cas de grandes quantités. Ce procédé consiste à lessiver un sol pour récupérer l'effluent pollué par pompage dans la nappe située au-dessous.

Sur une très forte pollution très profonde, cette solution a été privilégiée en concurrence avec le confinement du site qui coûtait beaucoup plus cher. Elle a en outre l'avantage de s'intégrer parfaitement à l'exploitation du site, les effluents récupérés étant

traités par la station d'épuration de l'industriel. Le traitement est en revanche relativement long.

### IV.2- TRAITEMENT CHIMIQUE

#### IV.2.1- La mobilisation et l'extraction :

Communément assimilée à un lavage, la mobilisation d'un polluant par une solution et son transfert à l'extérieur du milieu pollué peut s'appliquer à quasiment tous les contaminants (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

##### a- Application in-situ :

Le principe est simple : le sol est aspergé par une solution, qui s'infiltre dans le sol et mobilise le polluant. La solution chargée du polluant mobilisé sera ramenée à la surface par pompage.

Cette méthode a pour principaux avantages d'être relativement peu chère et facile à mettre en place. En revanche, elle a les mêmes inconvénients que le lavage, à savoir un risque de dispersion. Il faut aussi faire très attention à l'état du sol après traitement : les solutions réactives ou toxiques peuvent sérieusement dégrader le sol.

##### b- Application sur site :

Le matériau excavé est au préalable criblé (pour éliminer les pierres et les morceaux grossiers) puis est ensuite mis en contact avec la solution dans une machine pendant un temps suffisamment long pour assurer un contact sol solution parfait pour provoquer la mobilisation et le lessivage du produit contaminant.

La mobilisation peut être obtenue par formation d'une émulsion, par stabilisation ou par transformation chimique.

Plusieurs types de produits peuvent être utilisés :

- *l'eau pure* : c'est le moins cher ; elle est utilisée pour des contaminants solubles ;
- *les tensioactifs* : ils sont utilisés pour des produits hydrophobes ; ils cassent les grosses molécules, ils favorisent le maintien du contaminant dans la solution ;
- *les solvants organiques* : au cas par cas ;
- *les acides- bases* : pour les métaux lourds et les composés organiques ;

- *un fluide supercritique* (le dioxyde de carbone) : il a un très grand pouvoir solvant à haute température et basse pression. Cependant, cette méthode est trop chère pour le moment mais est une solution d'avenir.

### IV.2.2-Réactions chimiques

Cette méthode est surtout utilisée pour des produits organiques, peu volatils et qui ne sont pas biodégradables (solvants chlorés, pesticides). L'objectif est de générer par la réaction des produits moins toxiques (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

a - L'oxydation :

Les différents solvants utilisés sont soit l'ozone, soit l'eau oxygénée :

· Ozone : pour des eaux polluées et des effluents liquides ; l'ozone ayant une durée de vie très limitée (il se transforme vite en dioxygène) à des conditions normales, il faut le fabriquer sur place

· Eau oxygénée : pour des composés organiques, pour modifier la mobilité de certains métaux  
Remarque : ces deux produits favorisent l'augmentation du dioxygène dans le milieu ce qui implique une meilleure biodégradation.

b-La réduction :

Les réducteurs utilisés sont des métaux sous forme de poudre, essentiellement le fer (pour sa grande disponibilité et son prix peu élevé). Ce procédé est très utile et très efficace mais elles ont comme principaux inconvénients de ne pas être spécifiques (l'oxydant peut être gâché dans d'autres réactions) et il faut faire attention pour les pesticides à ne pas former de produits plus stables et tout aussi toxiques.

c-La déchloration (déhalogénéisation) :

C'est la transformation de molécules chlorées en particules moins chlorées. On cherche à remplacer les ions  $\text{Cl}^-$  du composé organique par des radicaux  $\text{OH}^-$  car moins la molécule est chlorée, moins elle est réactive, dans la pratique, on ajoute de la soude.

### IV.3-TRAITEMENT THERMIQUE

Le traitement thermique est essentiellement employé ex situ pour la décontamination des sols pollués par des matières organiques facilement oxydables et largement convertibles en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ . Très peu de techniques de traitement thermique in situ sont développés dans la littérature (Colin, 2000).

### IV.3.1-Désorption thermique à basse température :

La désorption thermique à basse température est une méthode ex situ permettant d'extraire physiquement des sols les contaminants organiques volatils et semi volatils qui s'y trouvent. Les sols contaminés sont placés dans une chambre et chauffés jusqu'à ce que les hydrocarbures se volatilisent. Les gaz perdus, qui renferment les hydrocarbures, sont brûlés dans un appareil à oxyder, puis refroidis et passés dans un filtre à sacs pour en extraire les particules. Les sols traités peuvent alors être réacheminés au site d'excavation d'origine pour servir de matériau de remplissage propre. Ce nouveau procédé d'assainissement des sols constitue une solution de rechange économique et écologiquement saine par rapport à bon nombre de méthodes courantes de traitement des sols contaminés par les hydrocarbures (<http://www.on.ec.gc.ca/pollution/ecnps/>).

### IV.3.2-L'INCINERATION :

L'incinération est une technique très ancienne, depuis cinquante ans, elle a connu un développement considérable, s'adaptant à presque tous les déchets et tous les types de polluants. Elle consiste à utiliser la haute température pour détruire les produits polluants, qui sont convertis en gaz carbonique et en vapeur d'eau plus d'autres résidus de combustion. Au cours des dernières années, sont également apparues des unités mobiles d'incinération qui permettent de traiter le sol directement sur le site. Par contre, les coûts de traitement sont relativement élevés, et l'élimination des résidus est souvent problématique. On trouve sur le marché différents dispositifs (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>) :

- fours à lit fluidisé : Ils font appel à un matériau inerte, souvent du sable, pour améliorer le transfert de chaleur au sol à traiter. L'air de combustion est introduit à la base du lit dans un courant ascendant ;
- technique infrarouge ;
- fours rotatifs.

L'incinération se compose de deux étapes :

1. La volatilisation : se fait dans le four rotatif à 400°C.
2. La destruction : à plus de 1000°C.

Certaines précautions sont nécessaires lorsque les composants traités contiennent du soufre ou du chlore. On utilise alors une solution alcaline pour extraire par barbotage le chlore et le soufre.

### IV.4-TRAITEMENT BIOLOGIQUE (BIOREMEDIATION)

La bioremédiation est une technique de traitement de plus en plus utilisée afin de traiter des sols et des eaux contaminés par les hydrocarbures. Elle consiste principalement en l'utilisation des micro-organismes ou des plantes présents en milieu naturel afin d'améliorer, au moyen de processus métaboliques, La dégradation naturelle des contaminants par la minéralisation et l'oxydation de produits organiques, en produits tels que le dioxyde de carbone, l'eau et la biomasse. Il faut noter que le processus de la bioremédiation ne génère aucun sous- produit toxique (G.I.E, 2000).

Ces processus de dégradation biologique peuvent exiger la présence d'air, ou non. Dans certains cas, les voies métaboliques que les organismes utilisent pour s'accroître ou pour obtenir de l'énergie peuvent aussi être utilisées pour décomposer des molécules de substances polluantes. Dans ce cas (nommé cométabolisme), le micro-organisme ne retire aucun bénéfice direct. Les chercheurs tirent avantage de ce phénomène pour l'appliquer dans le domaine de la bioremédiation. Complète, une biodégradation parvient à détoxiquer des polluants jusqu'au stade du dioxyde de carbone (gaz carbonique), de l'eau et de sels minéraux inoffensifs (<http://www.kluyver.stm.tudelft.nl/efb/home.htm>).

Plusieurs types de bioremédiation existent, différents selon les conditions naturelles. On distingue (<http://www.biorem.net/>):

-L'atténuation naturelle : qui est le fait de laisser se développer les bactéries naturellement présentes dans les sols. Cette approche est passive et le processus de biodégradation dépend uniquement des conditions naturelles du site. Une diminution significative des teneurs en polluant est alors incertaine et ne peut être envisagée que sur un très long terme.

- La biostimulation : qui consiste à modifier les conditions naturelles d'un site pour en augmenter les taux de biodégradation par l'adjonction de nutriments et agents correcteurs du milieu. Cette méthode possède le désavantage d'être non sélective, et donc de faire croître indifféremment tous les types de micro-organismes, éventuellement toxiques ou pathogènes, présents naturellement sur le site avant intervention.

- La bioaugmentation : par laquelle onensemence un site par une grande quantité de bactéries et enzymes spécifiquement élevés et adaptés pour digérer un type précis de polluant.

### IV.4.1-Facteurs influençant les performances de la bioremédiation :

Pour optimiser le processus naturel de biodégradation, il est indispensable de bien connaître les différents facteurs influençant son bon déroulement, à savoir :

a) La nature du sol :

- La composition granulométrique de la fraction minérale solide, qui caractérise la texture du sol;
- La composition chimique : caractéristiques de la phase minérale et organique;
- Caractéristique physique : conductivité électrique et hydraulique,... etc.;
- Caractéristique géotechnique : teneur en eau, porosité, densité et indice de plasticité;
- Caractéristique biologique : nombre de germes par gramme de sol (UFC : unité formant colonie par gramme du sol), genre microbien des dégradeurs des HAP (Costes et Druelle, 1997).

b) La distribution de la pollution dans le sol :

- NAPL (phase liquide non aqueuse) ; Gouttelettes plus ou moins solidifiées;
- Adsorption à l'intérieur d'agrégats de fines particules;
- Adsorption autours de grains individuels (Costes et Druelle, 1997);

c) La concentration, la structure et les caractéristiques physico-chimiques du polluant :

- Proportion de 2, 3, 4,5 et 6 cycles aromatiques (le nombre de cycles influent sur les propriétés physico-chimiques des polluants : solubilité dans l'eau, pression de vapeur, dégradabilité, etc.);
- Densité et viscosité;
- Importance des fractions lourdes de ces goudrons associés aux HAP (résine, asphaltènes) (Costes et Druelle, 1997).

d) Les facteurs environnementaux :

Les paramètres environnementaux doivent favoriser la croissance des micro-organismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures. Puisque l'importance de ces facteurs varie d'un site à un autre, chaque site contaminé doit être évalué individuellement.

Rappelons quelques facteurs importants (<http://www.enviroaccess.ca/>; Costes et Druelle, 1997) :

- La température ;
- Le pH ;
- L'humidité ;
- La teneur en nutriment ;
- La teneur en oxygène ;
- Le potentiel d'oxydoréduction.

### IV.4.2-Les techniques de la bioremédiation :

#### IV.4.2.1 Bioréacteur

Le traitement biologique du sol en réacteur a eu lieu dans des enceintes closes équipé de système d'agitation mécanique. Les bioréacteurs sont plus particulièrement utilisés lorsque la pollution est concentrée et dans le cas où les microorganismes ont des difficultés à se développer dans des conditions non contrôlées. Le bioréacteur présente plusieurs avantages (Costes et Druelle, 1997) :

- Meilleur contrôle des paramètres de cultures (température, pH, nutriments) ;
- Oxygénation plus efficace ;
- Contact entre organismes et polluants plus intimes ;
- Transferts de matière et thermiques accrus.

On réalise la biodégradation du polluant dans un contenant installé sur le site.

On distingue les trois cas suivants dispositifs

(<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>) :

- Traitement des matériaux solides : on réalise des opérations d'homogénéisation puis on mélange avec de l'eau pour former de la boue. Les réacteurs mélangent ensuite la boue avec les micro-organismes et de l'air pulsé par le fonds des réacteurs est récupéré en sommet de cuve puis est traité avant d'être rejeté. La boue passe enfin dans un séparateur : la terre est remise en place, l'eau est recyclée.

- Traitement de l'eau : le principe est le même que pour les solides. Les réacteurs sont remplacés par des colonnes dans lesquelles l'eau est mise en contact avec un matériau neutre qui sert de support aux micro-organismes fixés.

- Traitement des gaz : l'emploi d'un biofiltre est la solution la plus répandue, qui est efficace et peu onéreuse. Le filtre biologique est formé de compost, milieu idéal pour la croissance des bactéries. Le rendement du biofiltre est directement dépendant de la hauteur de compost filtrant, et aussi de la vitesse du flux gazeux injecté. Le maintien de bonnes conditions d'utilisation permet d'obtenir un taux de dégradation des polluants au-delà de 90%.

### IV.4.2.2 Le compostage :

On fait plusieurs tas de quelques mètres de circonférence et d'un mètre de hauteur. On mélange la terre extraite à un substrat organique qui favorisera l'aération au cours du temps. Les rendements obtenus étant généralement très faibles, il vaut mieux réserver cette technique pour des contaminants aisément biodégradables (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

### IV.4.2.3 Le landfarming :

Cette technique consiste en l'épandage en faible épaisseur ( de l'ordre de quelques dizaines de centimètres) de sols pollués par des produits organiques, souvent d'origine pétrolière, sur une surface préparée à l'avance, le terrain pouvant être ensuite cultivé.

Cet épandage se fait sur des zones soigneusement confinées pour protéger le sous-sol de tout risque d'infiltration, avec l'installation par exemple de films de polyéthylène haute densité, qui doit pouvoir supporter le passage d'engins de labour. Le labour des terres permet de contrôler la percolation des contaminants vers les couches plus profondes du sous-sol, tout en assurant la réoxygénation des terres. On profite de cette opération pour ajouter des éléments minéraux tels que des engrais (Ballerini, 2000).

### IV.4.2.4 Traitement par les champignons :

La biodégradation de polluants récalcitrants, comme les HAP de haut poids moléculaire et les huiles lourdes, crée toujours un obstacle à l'utilisation généralisée des biotechnologies d'assainissement. Cette situation est attribuable au fait que les bioprocédés utilisent principalement les bactéries. Or, la majorité des réactions de biodégradation effectuées par les bactéries sont réalisées par des enzymes spécifiques, ce qui implique le transport des polluants à l'intérieur des cellules. Cette situation devient problématique lorsque

le sol contient des polluants fortement adsorbés sur les particules de sol, ou lorsque ceux-ci ont un poids moléculaire élevé, puisque les bactéries ne possèdent pas les enzymes spécifiques requises pour le transport. En contrepartie, certains champignons microscopiques ont la capacité de produire des enzymes extracellulaires non spécifiques. Ces enzymes de la famille des monoxygénases peuvent transformer les HAP de haut poids moléculaire, facilitant ainsi le traitement des sols contaminés par des composés plus complexes (Samson, 1994).

Récemment, des chercheurs ont constaté que les HAP ont des structures proches de celles des écorces de pin qui sont attaquées par des champignons filamenteux. Ces micro-organismes présentent aussi l'intérêt de travailler dans des pH plus acides que les bactéries et d'être moins exigeants en oxygène (voir chapitre le métabolisme des hydrocarbures).

L'utilisation des champignons est très efficace sur les HAP (>60%) reste cependant encore très limitée. Sur un chantier en 1998, 10 000 tonnes de terre polluée ont été traitées pour 80 000 Euros : les pollutions de départ atteignaient 10000 ppm et on a obtenu à la fin des pollutions de 10 ppm, soit un prix défiant toute concurrence pour un résultat exceptionnel ! Il y a ainsi eu quelques réussites sur des pilotes mais la méthode n'est pas encore complètement au point. Une société américaine a enregistré l'an passé des premiers résultats positifs sur les HAP, et l'on espère pouvoir traiter prochainement également les PCB.

Même si elle n'est pas encore parfaitement au point, le traitement par champignons est sans aucun doute une des grandes technologies de demain (<http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>).

### IV.4.2.5 Bioventing :

La technologie de traitement de sols par bioventilation consiste à injecter de l'air sous la nappe dans l'enclave contaminée, de façon à favoriser la biodégradation des contaminants organiques (hydrocarbures légers, essence, diesel) et à les entraîner dans l'effluent gazeux. En cas de phase flottante, celle-ci doit être récupérée avant de procéder aux travaux de bioventilation.

La technologie repose sur un réseau d'injection d'air, un réseau de pompage à vide et une unité de biofiltration de l'air vicié. Une soufflante de type régénérative peut être utilisée pour effectuer à la fois l'injection de l'air ou l'extraction des gaz viciés. L'automatisation du procédé est possible. Les sols traités par bioventilation ne sont pas excavés et restent donc en place après les travaux de décontamination. Le contrôle de l'efficacité du traitement est

effectué principalement par un bilan de masse (différence entre la quantité de contaminant initiale et la quantité extraite dans l'effluent gazeux). Des mesures de la contamination résiduelle dans les sols et les eaux souterraines sont aussi réalisées à intervalles réguliers (<http://www.enviroaccess.ca/fra/>).

### IV.4.2.6 Biosparging (biobarbotage) :

Cette technique, qui permet de traiter localement la zone saturée, consiste en l'injection d'air dans la zone aquifère, par des puits verticaux ou horizontaux, en dessous du niveau de la nappe d'eau.

L'enrichissement en oxygène de l'aquifère pollué peut être aussi réalisé par injection d'eau oxygénée, qui en se décomposant libère progressivement de l'oxygène. Les solutions utilisées renferment généralement des teneurs limitées en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ne dépassant pas 1000ppm afin d'éviter toute action bioacide potentielle.

D'autres accepteurs d'électrons tels que les nitrates ont déjà été introduits en zone saturée pour accélérer les processus biologiques de dégradation (Vogel et Ballerini, 2001).

### IV.4.2.7 Phytoremédiation :

Plusieurs processus naturels liés à la croissance des végétaux peuvent aider à nettoyer des composés organiques, des métaux et même des radioéléments qui contaminent des sites et des eaux. Les biotechnologies végétales qui en découlent sont englobées sous le nom générique de phytoremédiation. Elles sont un choix de plus en plus fréquent dans le monde lorsqu'il s'agit de rechercher des méthodes efficaces, peu coûteuses, générant peu de déchets et respectueuses de l'environnement pour assainir et restaurer des sites pollués (<http://www.bordeaux.inra.fr/>).

Parmi les mécanismes d'action des végétaux contre la pollution, on distingue :

- a) la phytoextraction : Certaines plantes, dites hyper-accumulatrices, ont acquis une capacité naturelle à accumuler des composés potentiellement toxiques dans leurs tissus pendant leur croissance.
- b) la phytostabilisation : la rhizofiltration qui consiste à développer une biomasse végétale sur les eaux contaminées ou usées peut être beaucoup moins chère que les méthodes

traditionnelles de filtration ou même d'autres biotechnologies utilisant des fermenteurs avec des micro-organismes.

c) la phytodégradation : Il s'agit de contribuer à la dégradation de composés organiques (ex : hydrocarbures, pesticides) en composés plus simples par des cultures de plantes appropriées. La présence de ces plantes a deux actions possibles:

- favoriser la présence et l'activité dépolluantes de micro-organismes associés à leurs racines
- dégrader directement dans leurs cellules les composés polluants.

Il est possible de sélectionner les microorganismes associés dans ces biotechnologies végétales, afin de renforcer l'efficacité des traitements ou d'accélérer les processus. La plante apporte l'énergie via des composés organiques libérés par ses racines et sa biomasse, ou sert d'hôte aux microorganismes. Les micro-organismes peuvent aider les végétaux à s'établir dans un milieu pauvre en nutriments. De nombreuses plantes sont capables d'utiliser et de détruire des molécules organiques pendant leurs croissances : des organochlorés, d'autres pesticides, des molécules entrant dans la composition d'explosifs, des PCB (diphénylpolychlorés), des TCEs (trichloréthylène), des HAPs (hydrocarbures polyaromatiques) et d'autres résidus pétroliers.

d) la phytovolatilisation : Des plantes ont naturellement l'aptitude d'absorber des contaminants. Puis, lors du métabolisme, les contaminants ou leurs dérivés sont associés dans des composés volatiles qui sont libérés dans l'atmosphère.

Pour les sites très pollués où les végétaux ne peuvent pas directement s'installer, l'apport d'amendements organiques et minéraux aide à changer la forme chimique des contaminants dans les sols et à diminuer la phytotoxicité. Il s'agit des techniques d'inactivation, pratiquées sur le site ou une zone de traitement. Des plantes peuvent ensuite être installées en complément. Il peut s'agir de plantes relativement tolérantes, n'accumulant pas les contaminants dans les parties susceptibles d'être consommées par des animaux, ou bien de plantes métallobytophytes.

#### IV.4.2.8 Biobarrières :

Dans beaucoup de cas, l'atténuation naturelle n'est pas suffisante pour contrôler le nuage de pollution dans la zone saturée du sol et ne peut donc pas prévenir la migration des polluants vers les captages d'eau potable. Pour remédier à cette situation, des barrières

antimigrations telles que des puits d'injection d'air, des puits remplis de composés aptes à relarguer très progressivement de l'oxygène (peroxyde de magnésium), des tranchées d'interception avec flux d'air ou d'autres accepteurs d'électrons, peuvent se révéler très utiles. Les barrières peuvent encore être des tranchées remplies d'un support (granulés de tourbe) ou des plaques d'acier perforées sur lesquels des microorganismes adaptés aux polluants en place sont fixés. Ces barrières doivent être placées à une bonne distance de la source de pollution pour que la teneur en polluants soit compatible avec la capacité biologique des micro-organismes fixés (Vogel et Balerini, 2001)

### IV.4.2.9 Traitement en biopile :

La biopile est une technique qui prévoit la mise en tas du sol excavé. Pour satisfaire les contraintes techniques et/ ou législatives, le tas à traiter sera recouvert d'une membrane imperméable, et la gestion des entrées sorties des phases liquides et gazeuses devra être parfaitement maîtrisée. Pour améliorer le rendement (70 à 90%), on ajoute si possible des nutriments et des micro-organismes à la terre à traiter

Le matériau à traiter est installé sur une surface imperméable, légèrement en pente; un tas de plusieurs mètres de haut est façonné et taluté, qui peut s'étendre sur un périmètre de quelque mètres à quelques dizaines de mètres de large, et sur plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines de mètres de long. A la base du tas, un système de tuyauterie est installé dans une couche drainante (gravier); il permettra une aération efficace de l'ensemble du matériau, selon une répartition régulière. Au sommet du tas, un dispositif d'aspersion (de type agricole le plus souvent) est mis en place; il servira à humidifier le matériau et, éventuellement, à ajouter des nutriments et/ou des micro-organismes. Un réseau de rigoles ceinture le dispositif, afin de pouvoir récupérer les effluents sortant du tas et coulant sur une dalle imperméable. Enfin, l'ensemble est recouvert d'une membrane plastique, l'isolant de l'extérieur (Lecomte, 1995 ; <http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/> ).

a) Le fonctionnement du dispositif est le suivant :

- La quantité de nutriments nécessaire peut être ajoutée à la terre à traiter avant la mise en tas (et éventuellement des micro-organismes). Dans le cas contraire, les nutriments en solution sont ajoutés par le système d'aspersion sommital.

- Percolant au travers du tas, les effluents liquides sont récupérés via le réseau de rigoles, envoyés dans une cuve et recyclés avant d'être injectés à nouveau. La concentration en nutriments est au besoin réajustée, et en cas de baisse de l'activité bactérienne, des ajouts de micro-organismes peuvent être effectués directement dans la cuve.
- Au démarrage de l'opération, une aspiration des gaz est réalisée par le système de drainage du fond. Dans un premier temps, cette aspiration permet de récupérer un maximum de composés polluants volatils. Ceux –ci sont traités dans un filtre (biologique ou charbon actif) avant que l'air extrait ne soit évacué dans l'atmosphère.
- Lorsque le dégazage des produits volatils diminue, l'aspiration des gaz peut être arrêtée et le dispositif de pompage des gaz inversé. Au lieu d'aspirer, on injecte au contraire de l'air frais par la base du tas, provoquant ainsi une augmentation significative de la vitesse de biodégradation.

Pendant l'aspiration des volatils, le pompage maintient un débit du flux gazeux important. Par contre, pendant l'injection d'air frais, un débit faible est conservé au niveau du pompage.

Le dispositif est aménagé de façon à permettre d'une part l'échantillonnage de terre traitée, et d'autre part la mesure en continu d'un ensemble de paramètres déterminants pour le bon fonctionnement du système, tels le pH, la température, le taux d'humidité, la teneur en gaz polluants de l'air ambiant... les échantillons sont prélevés à l'intervalles réguliers et analysés pour les nutriments, les produits polluants à dégrader et éventuellement certains métabolites intermédiaires. La gestion de l'ensemble de ces résultats est effectuée par le poste central du contrôle (Lecomte, 1995).

### b) Limites d'application

Les facteurs limitant l'applicabilité de la technologie sont:

- la perméabilité du sol (il est préférable que le sol ne contienne pas plus de 60 % de silt et d'argile);
- le caractère réfractaire de certains contaminants à la biodégradation (PCB et autres hydrocarbures chlorés) ;
- la présence de substances toxiques en concentration élevée dans le sol (cuivre, plomb, mercure...).

Pour le traitement de l'effluent gazeux, un contrôle rigoureux des filtres permet d'assurer un rendement stable.

La technologie ne permet pas d'éliminer les contaminants inorganiques comme les métaux (<http://enviroaccess.ca/fra/>).

Cette technique permet aujourd'hui de traiter avec un excellent résultat les sols et nappes pollués par des produits organiques à l'exception de pollutions particulièrement récalcitrantes (<http://rhodia-eco-services.com/>).

Le but de notre travail est d'essayer, de restaurer un sol contaminé par du gazoil et d'étudier de près le métabolisme microbien qui s'accompagne avec, durant une période de 90 jours. La technique de biorestauration mise au point est la biopile (procédé breveté par biogénie inc aux Etat -Unis et au Canada) dont le principe consiste à optimiser les conditions de biodégradation du contaminant dans le sol après excavation (ex-situ).

Notre travail consiste en:

- ✓ Échantillonnage (excavation du sol et préparation du sol) ;
- ✓ Caractérisation physicochimique du sol ;
- ✓ Analyse microbiologique ;
- ✓ Caractérisation des hydrocarbures ;
- ✓ Production du sol enrichi par bioréacteur ;
- ✓ Traitement en biopile ;
- ✓ Suivi des paramètres de la biodépollution.
- ✓ Modélisation de la croissance et de la biodégradation

I- Une étude de faisabilité :

Afin de confirmer le choix du procédé « biopile » comme méthode de biorestauration le mieux adaptée à notre sol, il est nécessaire d'effectuer une étude de faisabilité.

En effet plusieurs questions s'imposent pour la vérification de la faisabilité de ce type de traitement :

- Quel type de contaminant est à l'origine de la pollution ?
- Quel est le degré de contamination ?
- Quelle est la capacité maximale de rétention d'eau du sol ?
- Quel est le nombre de micro-organismes par gramme du sol ?
- Quel est le nombre de micro-organismes dégradeurs du HAP ?
- Quelle est la part du limon du sol ?

Pour répondre à ces questions, on a effectué une caractérisation physico-chimique, microbiologique et granulométrique du sol afin d'estimer son pouvoir auto-épurateur (Figure V-1).

II- L'expérimentation

Elle repose sur la préparation des essais suivants :

### 1- Essai témoin :

- Un lot du sol contaminé sans aucun apport extérieur en nutriments et sans aération (atténuation naturelle).

### 2- Essai en biopile :

- Un essai sur la petite installation « B<sub>1</sub> ».
- Deux essais sur la grande installation « B<sub>2</sub> ».

## III- Matériel d'étude

### 1-L'échantillon de terre

Dans notre travail nous avons utilisé un sol provenant de la zone industrielle de Oued Smar (Alger) où se trouve des dépôts du sol contaminé par du gasoil de différentes entreprises (c'est des remblais des sols contaminés par le gas-oil).

Le prélèvement est effectué selon la norme française (X31-100) dont le principe consiste à exécuter un certain nombre de prélèvements élémentaires dans une zone présumée homogène et une couche de profondeur donnée.

Cet échantillon est par la suite acheminé au laboratoire où il est stocké à température ambiante en vue d'être étudié.

La préparation de l'échantillon pour les essais est réalisée selon la norme française (X31-101), Les échantillons mélangés, séchés à l'air libre, tamisés (maille 2mm) afin d'éliminer les débris rocailloux et conserver dans un endroit sec et à l'abri de la lumière (AFNOR, 1987).

### 2-Les nutriments

Les produits utilisés dans l'alimentation nécessaire pour la croissance des microorganismes sont :

- L'urée comme source d'azote ;
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> comme source de phosphore.

Les quantités de chaque entité seront évaluées sur la base du rapport C/N/P fixé à 100/10/1 cité par Comeau (1999), les nutriments sont dissous dans de l'eau déminéralisée destinés à assurer l'humidité. La source de carbone est fourni par le contaminant lui même.

### 3-La biopile

Deux biopiles ont été construites au niveau du laboratoire BioGep:

- Une petite installation possédant la capacité de 2 kg de sol contaminé à traiter « B<sub>1</sub> »;
- Une grande installation possédant la capacité de 149 kg de sol contaminé à traiter « B<sub>2</sub> ».

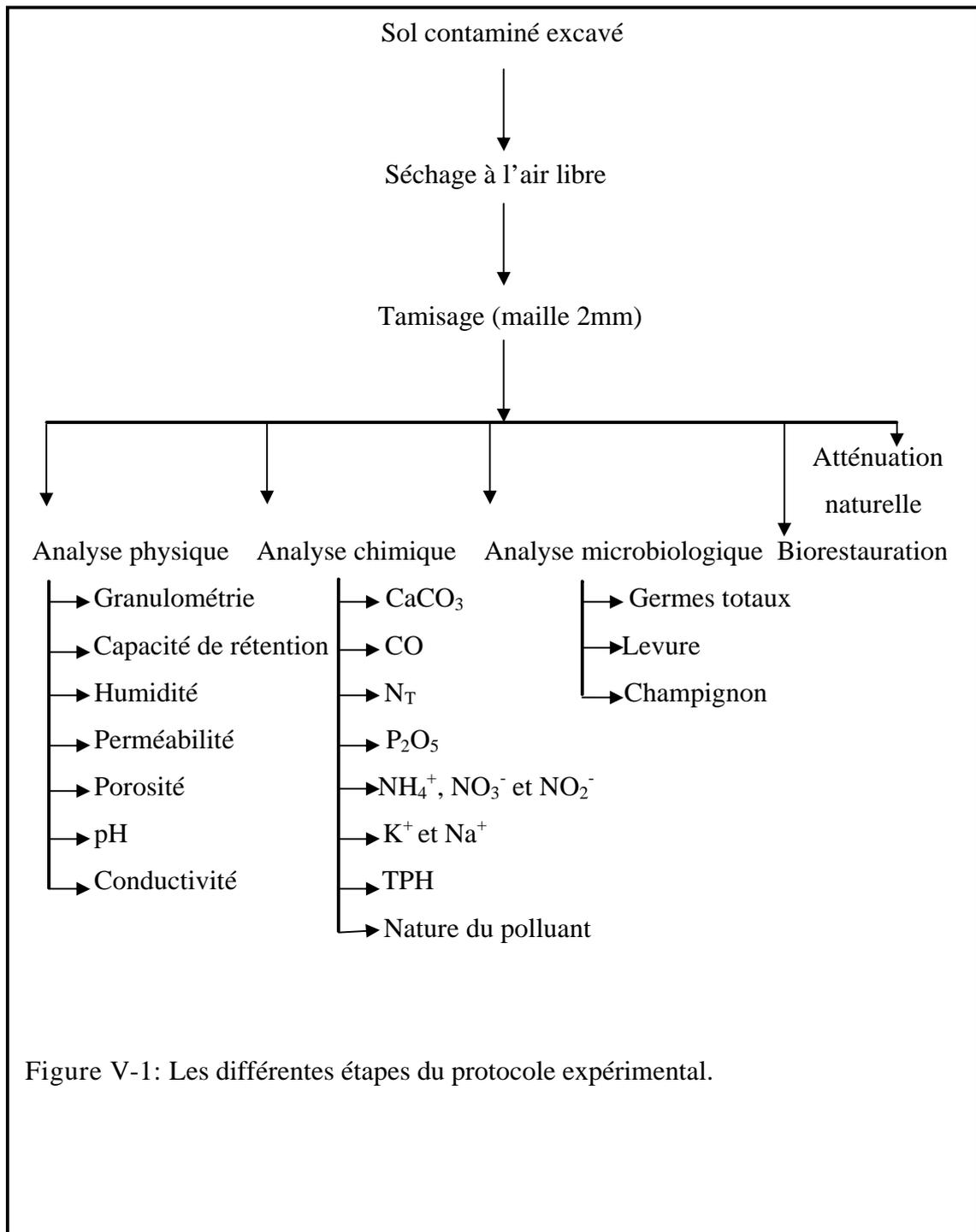


Figure V-1: Les différentes étapes du protocole expérimental.

### 3-1-Description de la biopile

Les deux biopiles (Figures V-2 et V-3) se composent essentiellement de:

Une surface imperméable légèrement inclinée (un système en pente). Celle-ci est aménagée en cuvette de rétention, avec drain de récupération afin de recueillir les eaux de lixiviation qui seront éventuellement recyclées ;

Une toile perforée (semi-perméable) appliquée sur la biopile ;

L'aération est assurée par des canalisations perforées installées à la surface de la cuvette et reliées à un compresseur.

L'humidité et les nutriments sont assurés par arrosage.

Le dispositif est aménagé de façon à permettre la mesure en continu d'un ensemble de paramètres déterminants pour le bon fonctionnement du système.

## IV- Méthodes d'étude

### 1- Analyses du sol

Des analyses de caractérisation de l'échantillon étudié ont porté sur les paramètres suivants :

#### 1-1-Analyse granulométrique :

L'analyse granulométrique du sol est déterminée suivant la norme (NF X 31-107). La présente norme a pour principe la mise en suspension des particules minérales, séparation des différentes classes de particules par sédimentation et enfin prélèvements des fractions fines par la méthode de la pipette (AFNOR, 1987).

#### 1-2-La capacité de rétention en eau :

Elle représente la fraction d'eau emmagasinée dans les micropores, la capacité de rétention en eau est mesurée selon la méthode par pression dont le principe repose sur la détermination de la quantité d'eau d'un échantillon de sol retenue sous une force de rétention n'excédant pas  $1000 \text{ g/cm}^2$  (Aubert, 1978).

#### 1-3-La conductivité électrique (NF X 31-113) :

La présente norme repose sur l'extraction des sels d'un échantillon de terre, solubles dans l'eau, dans des conditions bien définies et dans un rapport terre sèche/eau égale à 1/5 (AFNOR, 1987).

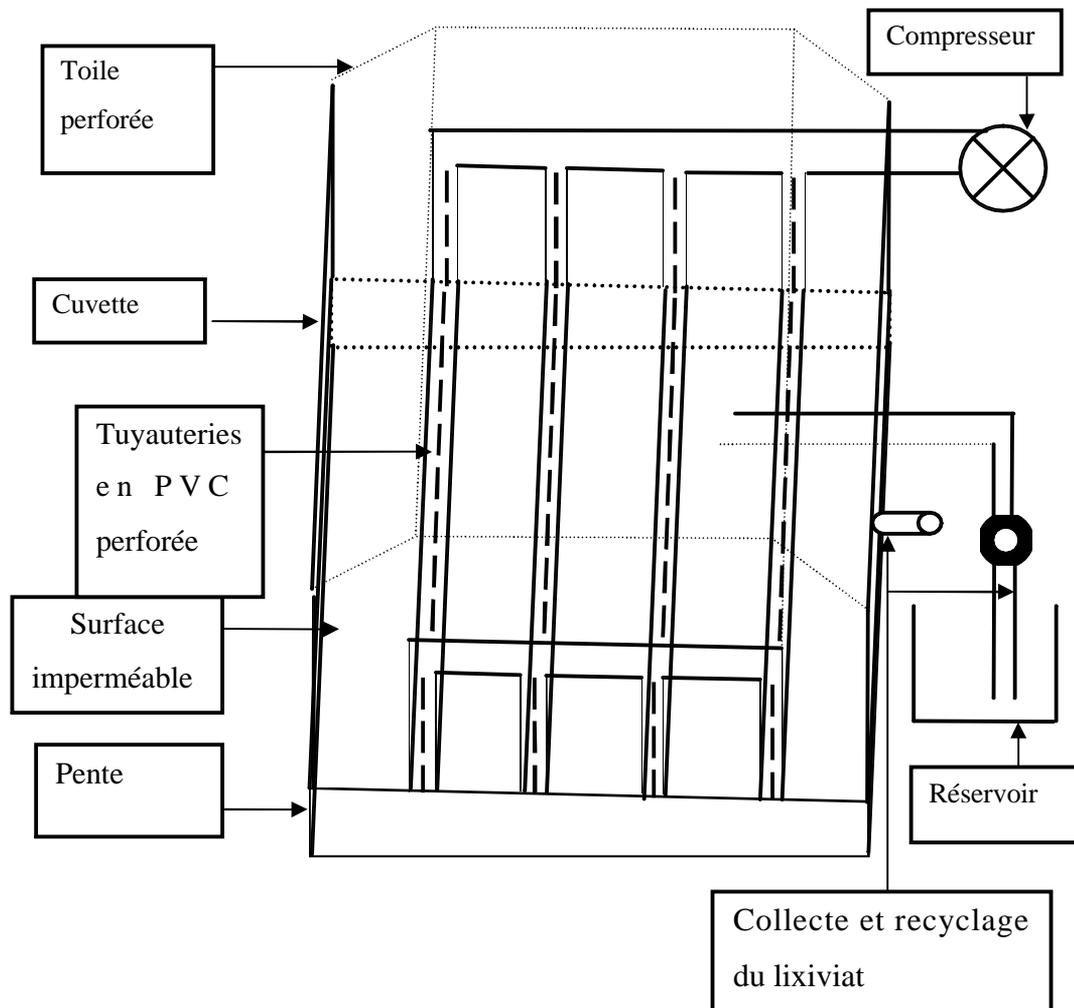


Figure V-2 : Schéma général du dispositif « Biopile ».

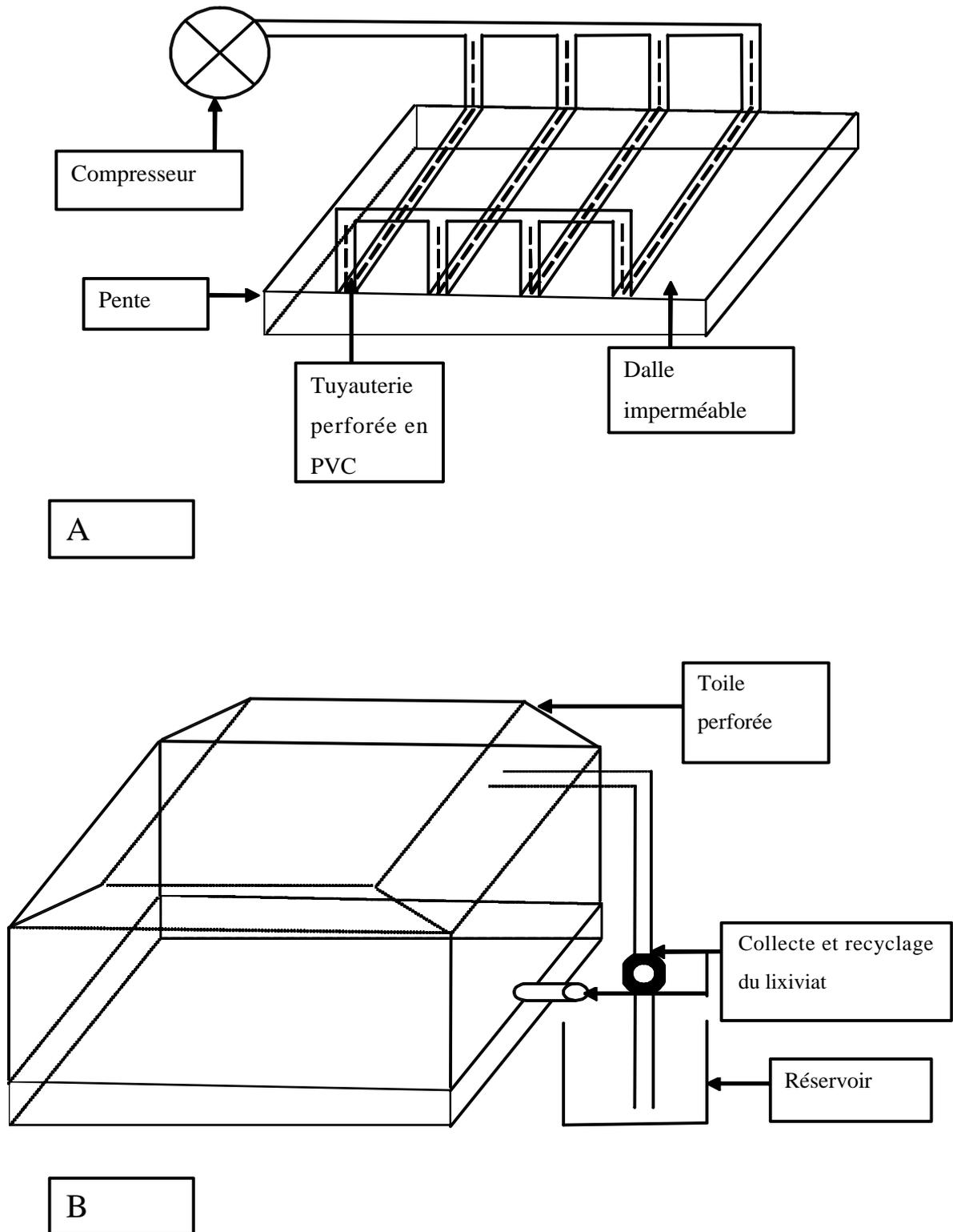


Figure V- 3 : Schéma détaillé de la biopile : A- système d'aération et la plate forme.

B- cuvette de rétention.

#### 1-4-Le pH (NF X 31-103) :

C'est la mesure du pH (H<sub>2</sub>O) par la méthode électrométrie. Elle s'effectue dans des conditions déterminées (rapport massique prise d'essai / solution : 1/2,5) de la différence de potentiel existant entre une électrode de mesure et une électrode de référence plongée dans une suspension aqueuse de l'échantillon de sol (AFNOR, 1987).

#### 1-5-L'humidité (NF X 31-102) :

Elle est basée sur la différence de poids de la prise d'essai avant et après séchage à 103°C. La teneur en matière sèche est calculée à partir de l'humidité (AFNOR, 1987).

#### 1-6-Détermination de la porosité :

La porosité totale d'un sol est égale au volume des vides exprimé en % du volume total. Elle permet d'apprécier la perméabilité et l'aération d'un sol. La mesure est réalisée selon la méthode des densités (Aubert, 1978).

#### 1-7- Détermination de la perméabilité :

Dans un tube de verre ouvert aux deux extrémités, on place une certaine quantité de la terre fine obtenue après traitement particulier du prélèvement. Au travers de celle-ci on fait passer de l'eau sous une charge constante. La quantité d'eau recueillie permet de calculer un coefficient K (hauteur d'eau infiltrée par heure sous une charge de 1cm et au travers d'une colonne de terre d'une épaisseur de 1cm) (Aubert, 1978).

#### 1-8-Evaluation du calcaire total « CaCO<sub>3</sub> » (NF X 31-105):

Détermination volumétrique du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dégagé sous l'action d'un acide fort à température ambiante (du laboratoire) par l'échantillon de terre préparé pour essai (AFNOR, 1987).

#### 1-9-Le carbone organique « CO » (NF X 31-109):

C'est l'oxydation du carbone organique de la prise d'essai dans des conditions bien définies, par une quantité en excès de dichromate de potassium en milieu sulfurique à température contrôlée ou à ébullition. Les ions chromiques Cr<sup>3+</sup> formés sont dosés par spectrophotomètre.

---

---

La teneur en matières organiques est évaluée en multipliant la teneur en carbone organique par un coefficient de 1.7 (AFNOR, 1987).

1-10-Détermination des cations échangeables (NF X 31-108) ou (NF X 31-130):

Ces normes ont pour principe l'extraction des cations du sol par agitation de la prise d'essai à l'aide d'une solution d'acétate d'ammonium à pH 7 avec un rapport de mélange d'extraction de 1/20 (m/v). Le dosage des cations  $K^+$  et  $Na^+$  par spectrophotométrie de flamme (T 20-001) (AFNOR, 1987).

1-11-Dosage du phosphore «  $P_2O_5$  » (NF X 31-116) :

Le dosage du phosphore est déterminé selon la méthode Olsen dont le principe repose sur l'extraction des formes de phosphore solubles par une solution de bicarbonate de sodium (0,5N), dans des conditions déterminées (solution d'extraction à pH 8,5 et rapport prise d'essai/solution : 1/20 (m/v)) (AFNOR, 1987).

1-12- Dosage de l'azote total «  $N_T$  » (NF X 31-111) :

La teneur en azote total est déterminée par la méthode Kjeldahl, cette norme a pour principe de minéraliser l'azote organique par l'acide sulfurique en présence d'un activateur de minéralisation, distillation de l'azote ammoniacal formé et titrage dans une solution d'acide borique (AFNOR, 1987).

1-13-Dosage de l'azote minérale ( $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  et  $NO_2^-$ ):

Le dosage repose sur l'extraction de l'azote ammoniacal, l'azote nitrique et l'azote nitreux présent dans le sol par une solution de KCl (2N). L'azote ammoniacal et l'azote nitrique sont dosés successivement dans le filtrat par distillation au Büchi, en présence d'oxyde de magnésium (MgO) calciné et l'alliage de Dewarda (Boughedaoui et al, 1986; Aubert, 1978). En revanche, l'azote nitreux est déterminé dans le filtrat selon la norme (NF T 90-013), cette présente norme a pour principe la diazotation de la sulfanilamide par les nitrites, en présence de dichlorure de N-(1-naphtyl) éthylène-diamine (AFNOR, 1979).

1-14-Analyse des hydrocarbures:

Pour déterminer la teneur et la nature en hydrocarbures dans notre sol, on a réalisé deux types d'analyses :

- Une analyse qualitative par chromatographie en phase gazeuse;

- Une analyse quantitative par spectroscopie infrarouge.

Avant d'effectuer ces analyses, on procède tout d'abord à l'extraction des hydrocarbures présents dans le sol (2g) par le tétrachlorure de carbone (50 ml), l'extraction est réalisée dans un extracteur soxhlet TECH. Après extraction, l'extrait est recueilli dans du sulfate de sodium anhydre puis filtré sur une colonne qui contient du florasil 60-100mesh afin d'éliminer les composés polaires.

- La teneur en hydrocarbures de l'extrait purifié est dosé par spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier, selon un logiciel de quantification suivant la norme (T 90-114) améliorée par la firme Nicolet pour les sédiments. La présente norme a pour objet le dosage des hydrocarbures totaux (TPH) des produits hydrocarbonés extractibles par le tétrachlorure de carbone en milieu acide, non retenus sur l'agent adsorbant et donnant un maximum d'adsorption dans la région de 3290 à 3510 nm.
- L'identification des composés extraits est effectuée par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur FID, après avoir concentré l'extrait purifié (Rodier, 1996).

#### 1-15-Analyse microbiologique :

Afin d'estimer le pouvoir autoépurateur du sol, on a :

- Dénombré les germes totaux (bactéries) sur gélose nutritive, après ensemencement en profondeur (incubation à 30°C pendant 24 ou 48h) ;
- Dénombré les mycètes (champignons, levures) sur milieu gélosé à base d'oxytétracycline (OGA), après ensemencement en surface par étalement (incubation à 20°C pendant 5 jours).

Les microorganismes sont extraits par la mise en suspension 1g du sol dans 10ml de l'eau physiologique et ensemencés sur chaque milieu, après dilutions ( $1/10^{\text{ème}}$ ). Le dénombrement des colonies se fait à l'aide d'un compteur de colonies.

Parmi ces paramètres, certains ont fait l'objet d'un suivi périodique et ceci s'étalant sur toute la durée de l'expérimentation.

#### 2-Conduite de la biorestauration

Afin de réduire le temps de traitement du sol en biopile, on a procédé tout d'abord à l'enrichissement biologique des sols contaminés.

### 2-1-Production du sol enrichi:

L'inoculum est préparé à raison de 1% du poids total du sol contaminé, au quel nous rajoutons les nutriments selon le rapport C/N/P fixé à 100/10/1. Le tout est transféré dans un réacteur contenant de l'eau déminéralisée à raison de 10% (sol/eau). Les réacteurs sont incubés à 25°C, sous agitation pendant trois jours. Le sol enrichi de cette façon est ensuite mélangé au sol à traiter et va servir d'inoculum pour le traitement en biopile (Figure V- 4).

### 2-2-Traitement en biopile

Le traitement en biopile consiste en:

- 1) Le sol est déposé sur la surface imperméable ;
- 2) Ajout des nutriments (azote, phosphore), selon le rapport C/N/P fixé à 100/10/1 ;
- 3) l'humidité est calculée entre 25% à 85% de la capacité de rétention en eau (Comeau, 1999) ;
- 4) Injection d'air à travers le sol ;
- 5)  $5 < \text{pH} < 9$  (Batelle et NFESC, 1996);
- 6)  $15^\circ < T^\circ < 40$  ;
- 7) Mélange une ou toutes les 2 semaines recommandé.

Au cours du traitement, certains de ces paramètres font l'objet d'un contrôle hebdomadaire :

- 1) Maintien de l'humidité entre 15% à 25% ;
- 2) Apport en nutriment si nécessaire, afin de maintenir le rapport C/N/P.

Les prélèvements sont effectués à des intervalles réguliers (tous les trois jours durant les deux premières semaines, ensuite une fois par semaine) pendant les trois mois de traitement, afin d'évaluer la croissance et le métabolisme cellulaire. Concernant la biopile « B<sub>2</sub> », les prélèvements sont réalisés en surface et en profondeur (30 cm).

Les paramètres à suivre sont :

1. Le pH ;
2. La teneur en hydrocarbures (TPH) ;
3. Le carbone organique ;
4. Le phosphore assimilable ;
5. Les différentes formes d'azote ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) ;
6. L'azote totale;

7. Le dénombrement des germes totaux (bactéries), champignons et levures.

2-3- Cinétique microbienne

2-3-1 Modélisation de la biodégradation :

La dégradation des hydrocarbures est typiquement représentée par la réaction d'ordre un :

$$\ln [\text{HC}] = -k t + \ln [\text{HC}]_0 \Rightarrow [\text{HC}] = [\text{HC}]_0 e^{-kt}$$

Où  $[\text{HC}]_0$  est la concentration des hydrocarbures à l'instant  $t_0 = 0$ .

La concentration des réactifs diminue exponentiellement en fonction du temps et évidemment celle des produits augmente exponentiellement en fonction du temps.

On a l'habitude de définir pour une réaction d'ordre 1 le temps de demi-vie (appelé aussi temps de demi-réaction): temps nécessaire pour consommer la moitié de la concentration des réactifs.

$$t_{1/2} = \ln(2)/k$$

Une représentation de  $\ln([\text{HC}]) = f(t)$  est une droite de pente  $-k$ .

Pour une réaction d'ordre un, la constante de vitesse  $k$  a les dimensions de  $[\text{temps}^{-1}]$ .

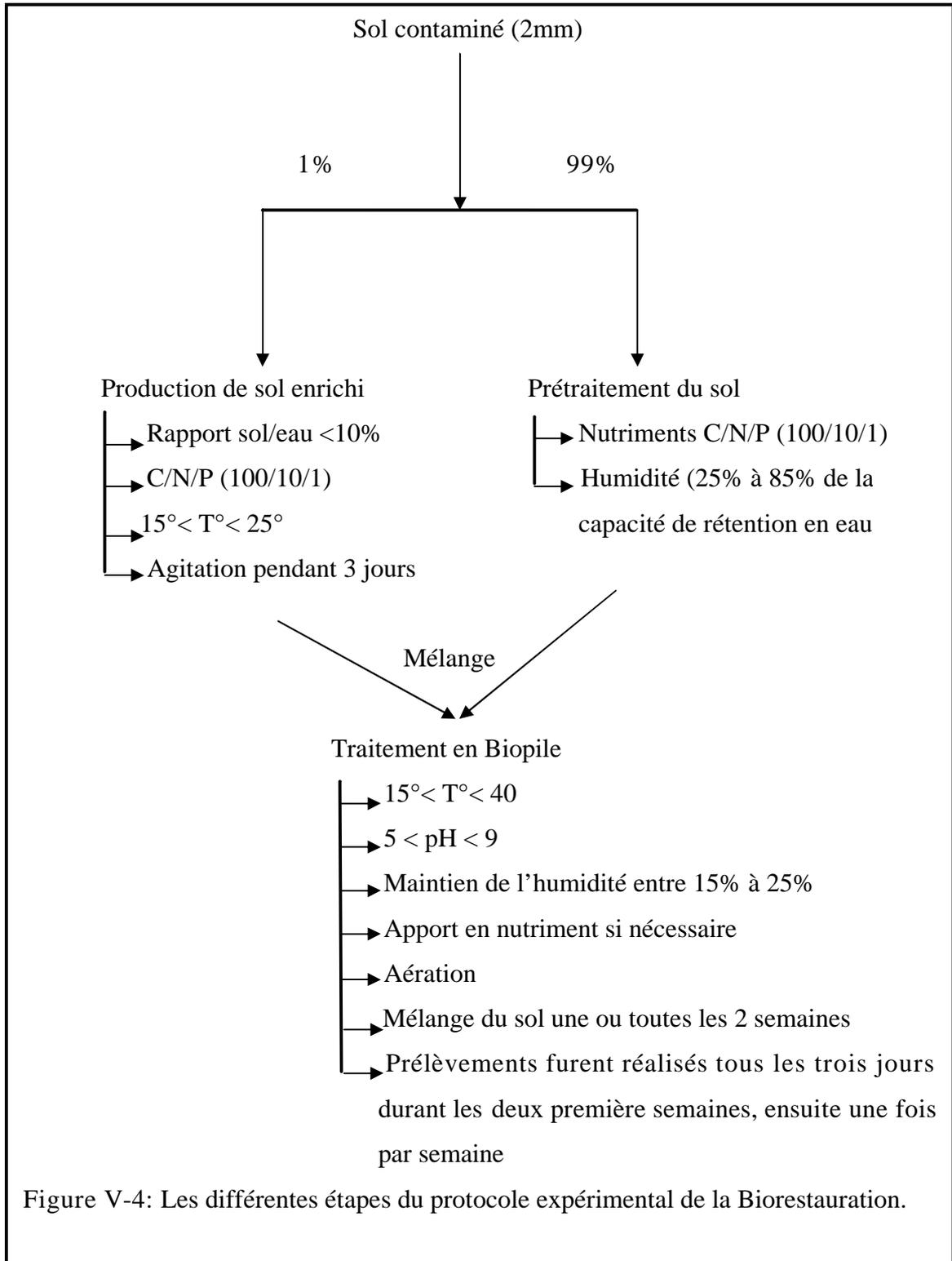


Figure V-4: Les différentes étapes du protocole expérimental de la Biorestauration.

## I. CARACTERISATION DU SOL

La caractérisation du sol est une étude préliminaire qui consiste à la détermination des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du sol à étudier. Elle permet de définir les paramètres à ajuster afin d'atteindre les conditions du bon déroulement de la biorestauration.

### I.1 Caractérisation microbiologique

Les résultats de l'analyse microbiologique sont représentés dans le tableau VI-1. Ces résultats affirment que ce sol présente une flore autochtone qui est de  $3.7 * 10^7$  UFC/Kg de sol. La norme pour toute biodégradation du sol exige au moins une teneur  $\geq 10^6$  germes/Kg de sol (Battele et NFESC, 1996).

Cela nous permet d'affirmer que ce sol pourrait être traité par procédé biologique en utilisant les micro-organismes déjà existants. Plusieurs auteurs ont débuté leurs traitements avec un nombre initial en microorganismes dépassant  $10^6$  germes /Kg de sol, c'est le cas de Margesin et Schinner (2001), Eriksson et al (2001) et Stapleton et al (1998) qui ont travaillé avec un nombre de germes initial respectivement de  $6.5 * 10^7$  UFC/g de sol,  $2.3 * 10^7$  UFC/g de sol et  $1.1 * 10^4$  UFC/g de sol.

Tableau VI-1 : Résultats de l'analyse microbiologique du sol pollué.

PARAMETRES	VALEURS
Germes totaux à 30°C (Bactéries)	$3.7 * 10^7$ UFC/Kg de sol
Levures	0 UFC/Kg de sol
Champignons	$2.8 * 10^7$ UFC/Kg de sol

### I.2 Granulométrie

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure VI-1. Il apparaît que le sol présente une texture sableuse avec 48.25% de sable fin et 51.25% du sable grossier ; avec 0% d'argile et de limon. Ce dernier est suffisamment perméable permettant le transfert de matières nutritives et une bonne oxygénation.

Selon Samson (1994), l'analyse granulométrique permet de fournir des renseignements sur le pouvoir d'adsorption du sol envers les contaminant et ainsi sur la difficulté qu'auront les bactéries d'accéder aux polluants. Il est ainsi plus facile de traiter des sols sablonneux par opposition aux sols argileux. Penberthy et Weston (2005) affirme que la teneur élevée en argile rend n'importe quel effort de remédiation particulièrement difficile.

### I.3 Caractérisation physico-chimique

L'analyse physico-chimique permet de vérifier si le sol constitue un environnement favorable à la croissance des microorganismes (Samson, 1994).

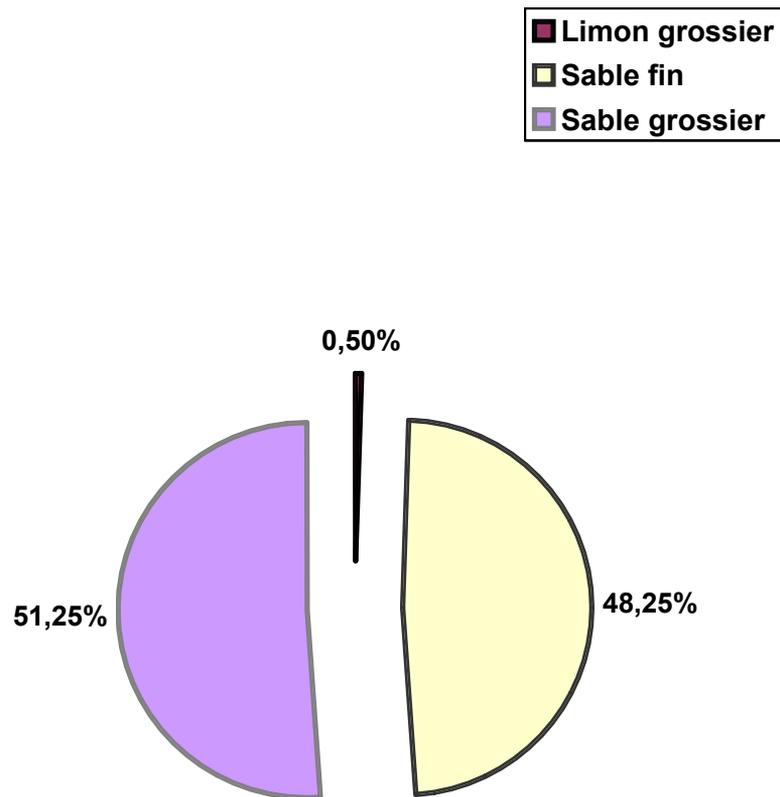
Selon nos résultats (Tableau VI-2), le taux d'humidité du sol n'est pas satisfaisant sachant que pour une bonne dégradation biologique dans la biopile, celui-ci doit être compris entre 15 et 25 % (Comeau, 1999). En effet la faible teneur en humidité est un facteur limitant important dans la biodégradation (Margesin et Schinner, 2001).

Tableau VI-2 : Résultats des analyses physiques du sol pollué.

PARAMETRES	VALEURS
pH	8.6
Humidité	1.81%
Matière sèche	99.98%
Capacité maximale de rétention d'eau	7.28%
Conductivité	0.87 ms/cm
Porosité	69.5%
Perméabilité	36.0cm/h

Le pH de notre sol (pH=8.6) est compris dans la marge optimale  $5 < \text{pH} < 9$  citée par plusieurs auteurs : (Battele et NFESC, 1996 ; Comeau, 1999). A ce pH, l'activité de la flore autochtone dégradante des hydrocarbures est maintenue.

La porosité excessive de notre sol, ainsi, que sa très grande perméabilité reflètent son caractère sableux. Cette structure assure le développement d'une activité biologique acceptable.



**Figure VI-1: Représentation des constituants du sol à dépolluer**

Les résultats chimiques (Tableau VI-3) indiquent un déficit en éléments azote et phosphore, selon Eckford et al (2002), la pollution des sols par les hydrocarbures (diesel, carburant) a comme conséquence un déficit en azote par rapport au carbone (par exemple le rapport C/N est supérieur à 250/1) et qui peut limiter la biodégradation des hydrocarbures. Ce qui nécessitera un enrichissement du sol avec ces éléments pour tout le traitement biologique. La flore microbienne a besoin d'éléments minéraux pour sa croissance, en particulier d'azote, dont les proportions optimales généralement admises sont de 10g d'azote et 1g de phosphore pour 100g de carbone (Ballerini, 1999). Ces éléments rentrent dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines...etc).

Prince et al (2003) rapportent que dans les environnements aérobies les éléments limitants les plus susceptibles sont l'azote et le phosphore, ainsi il est probable que la biodégradation soit limitée.

Les oligo-éléments ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) (Tableau VI-3) jouent le rôle de groupements prosthétiques indispensables au fonctionnement de la machinerie enzymatique des microorganismes dépolluants.

Tableau VI-3 : Résultats des analyses chimiques du sol pollué.

PARAMETRES	VALEURS
TPH	13 g/Kg du sol
Azote total	$7.7 \cdot 10^{-2}$ g/Kg du sol
Azote ammoniacal ( $\text{NH}_4^+$ )	$17.5 \cdot 10^{-4}$ g/Kg du sol
Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )	0 g/Kg du sol
Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )	$11 \cdot 10^{-4}$ g/Kg du sol
Matière organique	2.28%
CO	1.32%
Phosphore	$1.5 \cdot 10^{-2}$ g/Kg du sol
$\text{Na}^+$	$5.21 \cdot 10^{-3}$ meq/100g du sol
$\text{K}^+$	$5.35 \cdot 10^{-3}$ meq/100g du sol

---

Le profil chromatographique (Figure VI-2) obtenu par CPG montre l'allure d'un gasoil dont le nombre de carbone varie entre C12 et C26. Ce profil concorde bien avec ceux trouvés par Geerdink et al (1996), Haeseler et al (2001), Jeannot et al (2001) et Marchal et al (2003). Selon Vogel et Ballerini (2001), les hydrocarbures d'un gasoil sont plus lourds et moins volatiles avec un nombre de carbones allant de 12 à 25.

Le carburant Diesel contient généralement de basses quantités d'alcènes, il se compose de quatre classes :

- n- alcanes ou n- paraffines (hydrocarbures saturés linéaires);
- isoalcanes ou iso paraffines (hydrocarbures saturés branchés) (Pristène et phytène);
- cycloalcanes ou naphthènes (alcanes cycliques saturés);
- composés aromatiques.

Cependant, il contient 2000 à 4000 hydrocarbures, ce qui rend sa séparation par chromatographie en phase gazeuse incomplète. En fait, seuls les n-alcanes et quelques uns branchés peuvent être identifiés en tant que composés séparés (Marchal et al, 2003).

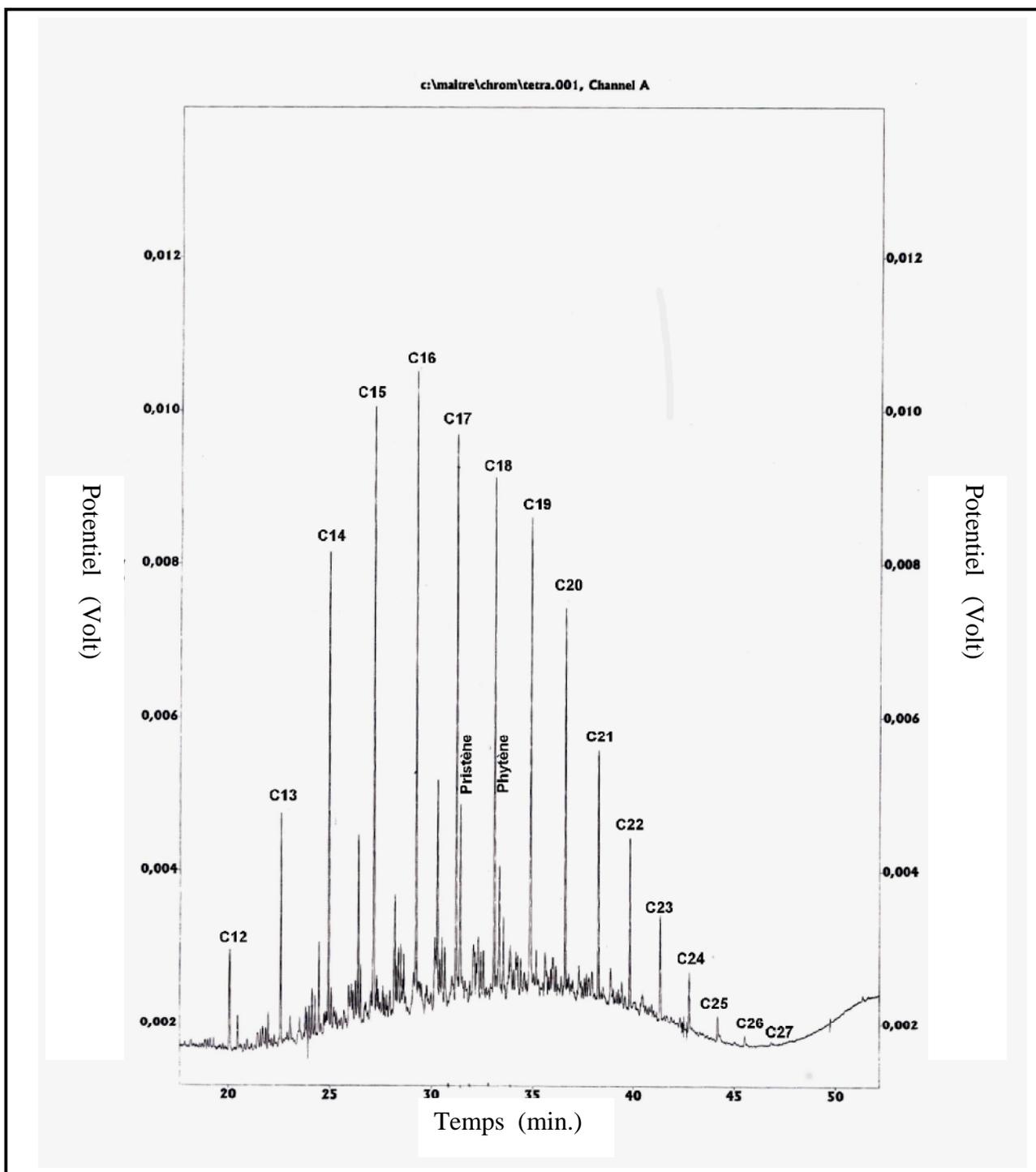
La concentration du polluant est déterminée par spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier (FTIR), elle est de 13 g/Kg de sol pour la grande installation (B2) et de 5.8 g/Kg pour la petite installation (B1).

Pour les besoins de nos essais, nous avons lancé deux installations, la première de petite dimension désignée sous le vocable de la petite installation (B1) et une installation de plus grande envergure désignée sous le vocable de grande installation (B2).

L'échantillon traité dans le cas de l'installation (B1) est le même sol contaminé utilisé dans la grande installation, mais seulement après une période de 7 mois où l'échantillon subit l'atténuation naturelle pour arriver une concentration de 5.8g/kg de sol.

## Conclusion

Les résultats obtenus de la caractérisation granulométrique, physico-chimique et microbiologique du sol pollué se sont révélés favorables à l'application du procédé de la biopile comme technique de la biorestauration.



Colonne capillaire en silice fondue de 50m (0,32mm de diamètre interne et 0,40 $\mu$ m épaisseur du film), injecteur split (T= 315°C), détecteur FID (T= 325°C), température de la colonne : 35°C pendant 5mn puis programmation à 6°C/mn jusqu'à 310°C, gaz vecteur : hélium, 1,5ml/mn sortie colonne, quantité injectée : 0,6 $\mu$ l.

Figure VI-2 : Profil chromatographique du gasoil obtenu par CPG –détecteur FID

---

## II. CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DES HYDROCARBURES :

### II-1 La biopile B2 :

Les figures VI-3 et VI-6 illustrent les profils de biodégradations du gasoil dans la grande installation de biopiles (B2) et son témoin.

Pour l'installation (B2), le témoin présente une concentration en hydrocarbures stable de 13 g/kg et ce pendant les six premiers jours. Ensuite, la concentration commence à décliner jusqu'à atteinte d'une valeur de 6.5 g/Kg correspondant à un rendement d'élimination de 50% au bout de 20 jours (Figure VI-4).

Le profil des courbes de dégradation révèle que la cinétique de la biodégradation du gasoil est différente en allant de la surface vers la profondeur. La concentration des TPH en profondeur passe de 13g/Kg à 6 g/kg (Figure VI-3) suivant une cinétique régulière d'ordre quasi nulle tout au long du traitement donnant un rendement de 53.9% au bout de 20 jours (Figure VI-4).

En revanche, l'allure de la courbe de biodégradation en surface suit une cinétique exponentielle aboutissant à une concentration finale de 5.3 g/Kg (Figure VI-3) (rendement de 59.2%) (Figure VI-4).

Il faut signaler que le procédé biopile a été interrompu après 20 jours de traitement suite à une panne au niveau de l'aération. A grande échelle, les canadiens (Comeau, 1999) ont signalé, parmi les inconvénients de la biopile l'éclatement des canalisations d'aération. L'arrêt de l'aération entraîne l'arrêt de la dégradation du gasoil ; mais l'avantage du procédé est la possibilité de fonctionner de nouveau après réparation de la panne. Selon Comeau (1999), la biopile peut fonctionner 12 mois par année.

Au cours des premiers vingt jours de traitement, une disparition progressive des nuisances et lixiviation a été notée. Selon le projet canadien DETALC (1994), la fin du traitement au niveau du site de Jonquière est marquée par l'obtention d'un sol qui ne sent plus de diesel et qui ne lixivie plus. Afin de pouvoir trancher sur la continuité de notre procédé, les bilans de la première phase de traitement ont été établis (concentrations finales et rendements). Nous avons jugé que les rendements obtenus après 20 jours sont insuffisants par comparaison avec le témoin (9.2% de différence à la surface et 3.9% en profondeur). De plus, nous n'avons pas encore atteint le critère B-C selon la politique canadienne de protection des sols qui est la

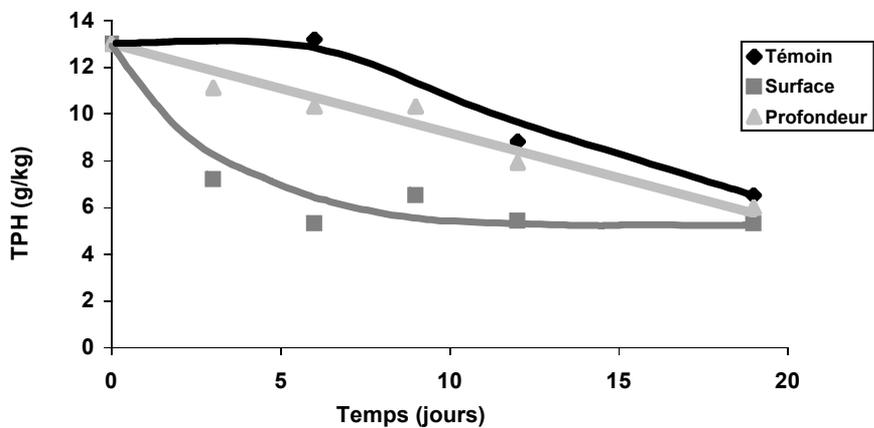


Figure VI-3: Cinétique de biodegradation du gasoil dans la biopile B2 et le témoin.

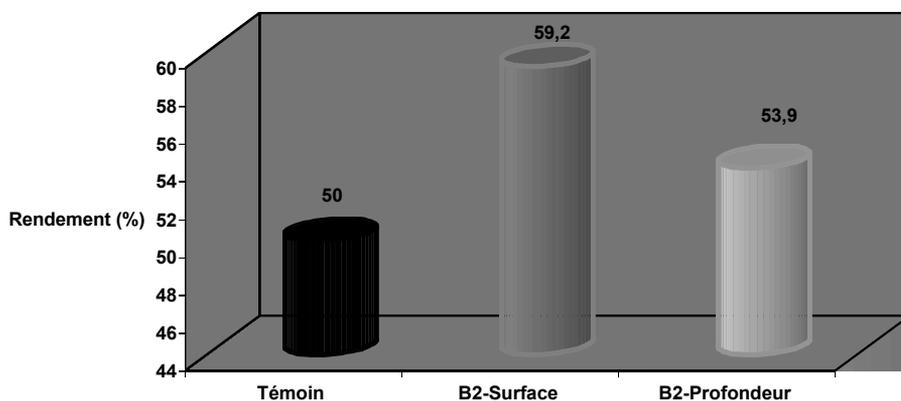


Figure VI-4 : Rendements d'élimination enregistrés pour la biopile B2 et le témoin après 20 jours de traitement

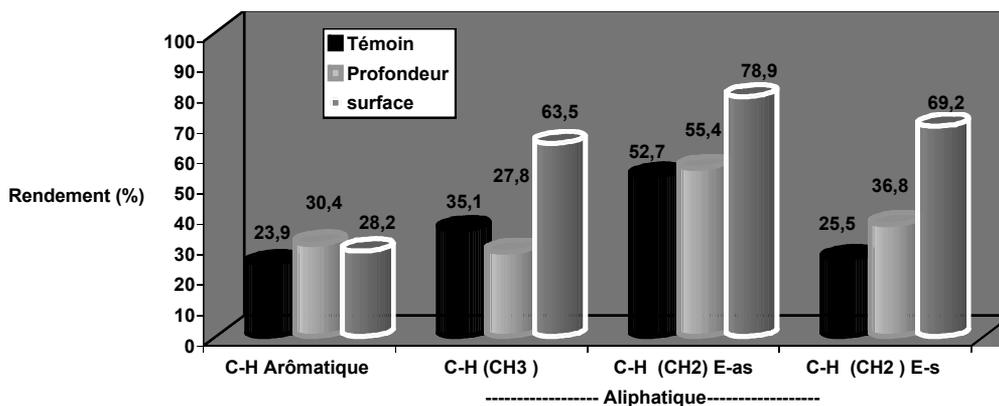


Figure VI-5: Rendements de disparition des liaisons C-H appartenant aux hydrocarbures aliphatiques et aromatiques du gasoil au cours de 20 jours de traitement dans la biopile B2

réduction de 80% de la concentration initiale pour les produits pétroliers C10-C50 (Comeau, 1999). Pour cela, nous avons relancé le traitement pour une période de 56 jours supplémentaires afin d'aboutir à des rendements meilleurs.

Les dosages effectués au redémarrage de la biopile montrent bien que la biodégradation du gasoil a stagné durant toute la période d'arrêt.

Les mêmes cinétiques ont été obtenues après redémarrage de l'aération (pour la B2) à la surface et en profondeur. Les concentrations enregistrées à la fin du procédé sont : 1.87g/kg à la surface et 1.9g/Kg en profondeur donnant des rendements d'éliminations finaux de 85.6% et 85.4% respectivement (Figure VI-6). Au cours de cette période la biodégradation au témoin est négligeable, le rendement final est de 55.4%, soit une différence de 5.4% par rapport au premier traitement (Figure VI-6).

De cette façon, nous pouvons juger que la plage « B-C- sol traité de façon optimale » est atteinte. Nous avons un rendement d'élimination supérieur à 80% avec des concentrations comprises entre 0,7g/Kg et 3,5g/Kg de matières sèches (Comeau, 1999). Nos résultats sont en accord avec ceux cités par Marchal et al (2003) et confirment que le taux de biodégradabilité du gasoil commercial est situé entre 60 et 73 % selon la microflore utilisée.

A partir des figures VI-4, VI-7, nous pouvons déterminer la contribution de chaque phase de traitement à la dégradation du gasoil, les données sont représentées sur le tableau VI-4.

Tableau VI-4- Récapitulatif des rendements de la biopile B2

	R <sub>f</sub> (%)	R (%)	R <sub>f</sub> (%)-R (%)
Témoin	55.4	50	5.4
Surface	85.6	59.2	26.4
Profondeur	85.4	53.9	31.5

R<sub>f</sub> : Le rendement final enregistré à la fin du procédé.

R : La contribution de la première phase.

R<sub>f</sub>-R : La contribution de la deuxième phase après redémarrage de l'aération.

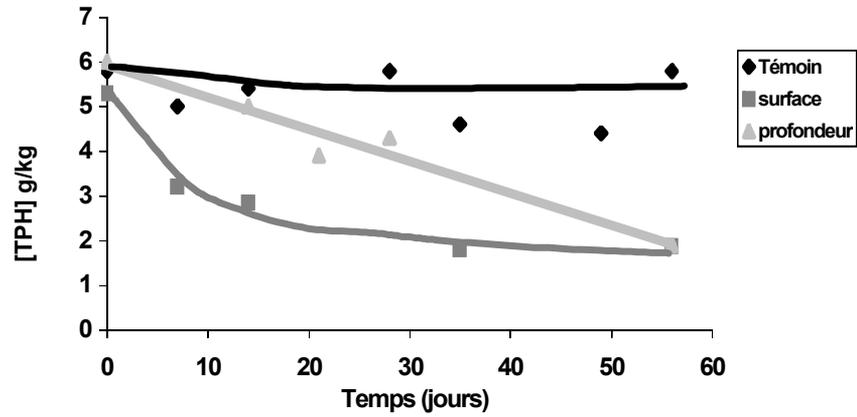


Figure VI-6 : Cinétique de biodegradation du gasoil dans la biopile B2 (après redémarrage de l'aération ) et le témoin

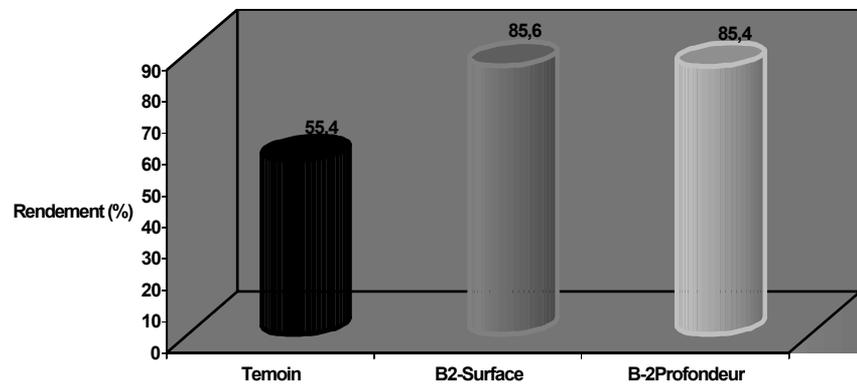
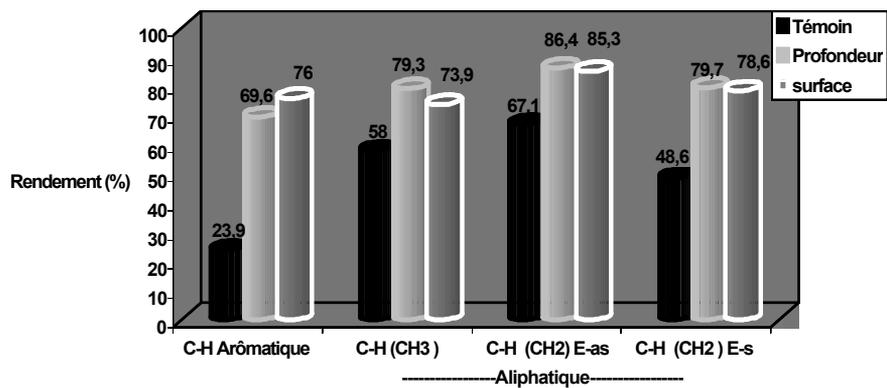


Figure VI-7: Rendements d'élimination enregistrés pour la biopile B2 et le témoin à la fin du traitement



FigureVI-8 :Rendements de disparition des liaisons C-H appartenant aux hydrocarbures aliphatiques et aromatiques du gasoil à la fin du traitement dans la biopile B2

---

Ces résultats nous montrent que la plus grande partie du polluant a été dégradée au courant des 20 premiers jours de traitement. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Eriksson et al (2001) qui signalent que le taux d'élimination le plus élevé des TPH est obtenu au 21<sup>ème</sup> jour de traitement.

Namkoong et al (2002), ont observé une rapide élimination des TPH dans la première quinzaine de traitement. Les hydrocarbures les plus simples pourraient être dégradés pendant la première phase. En effet, il a été constaté que les mêmes taux de dégradation ont été obtenus pour le témoin et la biopile (B2). La biodégradation du gasoil enregistrée au niveau du témoin réside essentiellement dans la capacité intrinsèque des microflores présente dans le sol. Il s'agit du phénomène d'atténuation naturelle du sol. Ballerini (1999), Solano- Serena et al (2001) et Haeseler et al (2001) ont signalé l'existence de ce phénomène. Le sol étant rarement stérile, la microflore en place en présence des polluants aura, en fonction des conditions physico-chimiques de l'environnement, tendance à métaboliser les polluants.

Le rôle de la biopile est mis en évidence surtout à la deuxième phase où les fractions réfractaires du gasoil nécessitent une aération et une microflore potentielle pour être éliminée. Ces conditions sont réunies au niveau de la biopile donnant des rendements nettement supérieurs par rapport au témoin où les conditions sont hostiles à l'activité microbienne. Margesin et Schinner (2001) démontrent que la biostimulation du sol par l'addition des nutriments a pour conséquence une perte sensiblement accrue d'hydrocarbures. Cette hypothèse apparaîtra plus clairement en étudiant la croissance microbienne au niveau du témoin et la biopile.

Contrairement à la première phase, l'aération apparaît donc comme un facteur déterminant dans la deuxième phase : nous avons une différence nette entre le témoin (non aéré) (5.4%) et la biopile (surface : 26.4% et profondeur ; 31.5%). Selon Ulfig et al (1998), Yeung et al (1997), l'aération du sol est un facteur critique qui affecte de manière significative le taux d'activité microbienne et donc la biodégradation des hydrocarbures dans la biorémediation. Vandecasteele et al (2001), confirme qu'il s'agit d'une façon générale d'une biodégradation aérobie.

Afin d'apprécier l'aspect qualitatif de la biodégradation du gasoil au cours des deux phases de traitement, nous avons suivi le déclin des absorbances infrarouges entre les points initiaux et finaux de chaque procédé. Il faut signaler que ces absorbances sont celles d'extraits obtenus à partir de prises d'essai de  $2g \pm 0.4$ . (Figure VI-9, VI-10).

---

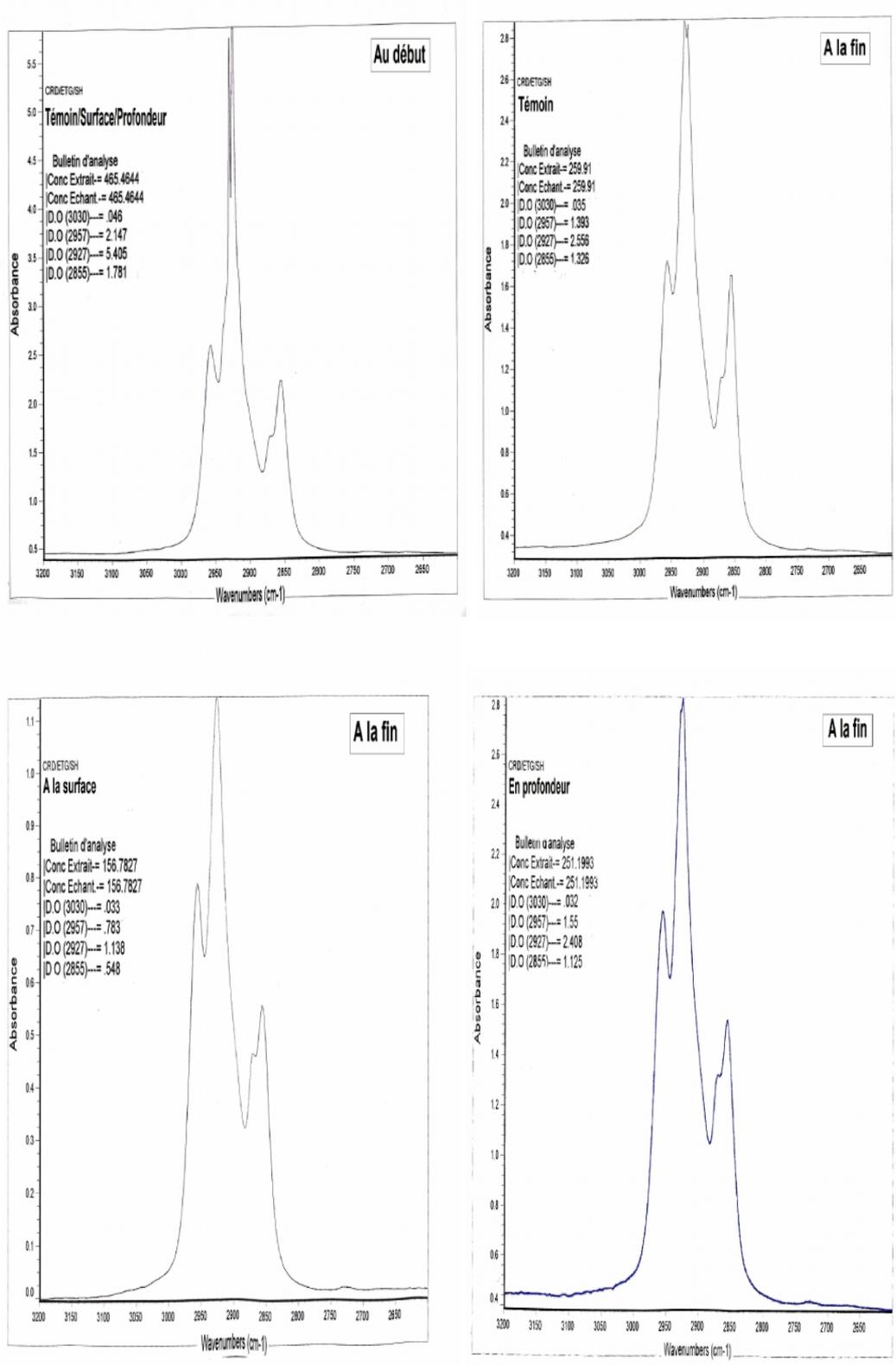
A partir de ces absorbances, nous avons calculé les rendements de disparition des liaisons C-H représentatives des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques. Les résultats sont représentés sur les figures VI-5, VI-8. En faisant la différence des rendements finaux et les rendements représentatifs de la première phase, nous faisons les constats suivants:

- Les liaisons C-H des hydrocarbures aliphatiques sont dégradées majoritairement pendant la première phase de traitement.
- Les liaisons C-H des hydrocarbures aromatiques sont dégradées en grande partie au cours de la deuxième phase de traitement suggérant que les fractions aromatiques simples sont dégradées pendant la première phase, suivies des fractions complexes (pendant la deuxième phase).

Les hydrocarbures complexes ne sont donc efficacement éliminés qu'après dégradation des hydrocarbures simples. Le palier final obtenu pourrait être dû aux fractions les plus complexes qui résistent à la dégradation. Marchal et al (2003), signale que la dégradation du gazoil est un processus inachevé ; Cependant, il n'est pas clair si la résistance partielle à la biodégradation est expliquée par la qualité intrinsèque du pétrole complexe ou par l'états d'incubation créant la limitation possible de transfert de l'oxygène et les hydrocarbures.

Plusieurs travaux traitent la priorité de la biodégradation des hydrocarbures chez les microorganismes :

- **Whyte et al (1998)**, signale que les alcanes à courtes chaînes sont dégradés plus aisément que les alcanes à chaînes longues.
- **Mohn et Stewart (2000)**, indiquent que les hydrocarbures branchés sont récalcitrants par rapport aux hydrocarbures linéaires dans une culture microbienne mixte.
- **Marchal et al (2003)**, expliquent qu'en particulier, le taux de dégradation peut être proche de 100 % lorsque les alcanes linéaires sont abondants. Les hydrocarbures récalcitrants à la biodégradation sont des cycloalcanes et des alcanes ramifiés, notamment ceux qui comportent des atomes de carbone quaternaires ou des groupements substituants consécutifs sur la chaîne carbonée principale.



**Figure VI-9 : Spectres infrarouges enregistrés au début et à la fin de la première phase de la biopile B2**

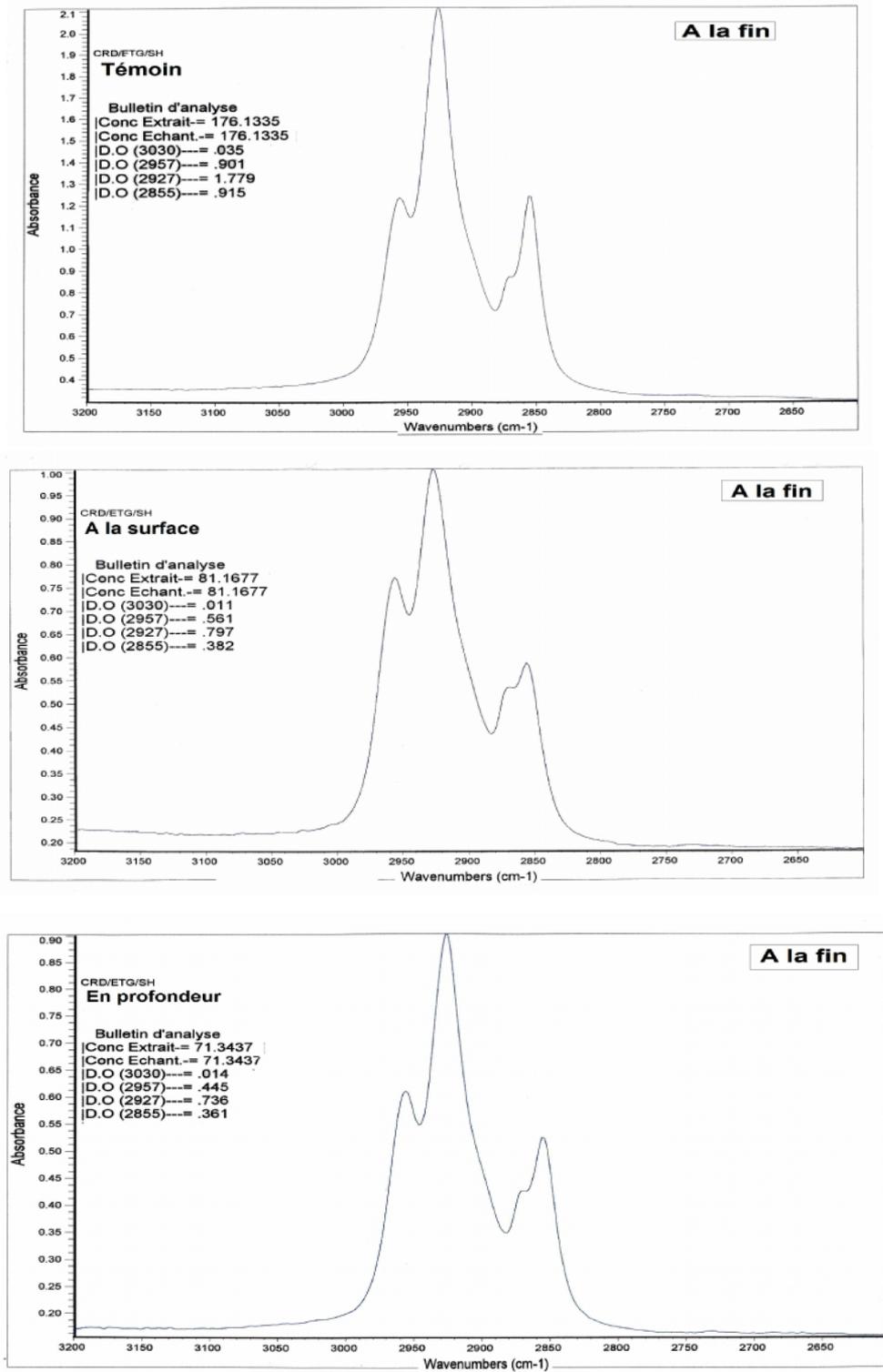


Figure VI-10: Spectres infrarouges enregistrés à la fin de la deuxième phase de la Biopile B2

- Eriksson et al (2001), Namkoong et al (2001), considèrent que le déclin des TPH du Diesel dépend du déclin des n alcanes.
- D'après Børresen et al (2003), les alcanes ayant des chaînes plus longues que C<sub>18</sub> représentent les fractions récalcitrantes du diesel. Il est probable qu'à la fin des essais ce sont les constituants récalcitrants du diesel (alcanes branchés et les aromatiques) qui restent.
- Et finalement, Xu et Obbard (2004) démontrent que la dégradation des HAP est plus faible que la dégradation des alcanes. Cependant, les aromatiques simples sont dégradés plus rapidement que les alcanes. Selon Solano- Serena et al (2001), la dégradation des isoalcanes démarre après celles des n alcanes, leur dégradation s'étale sur un mois et parfois ne sont pas complètement métabolisés.

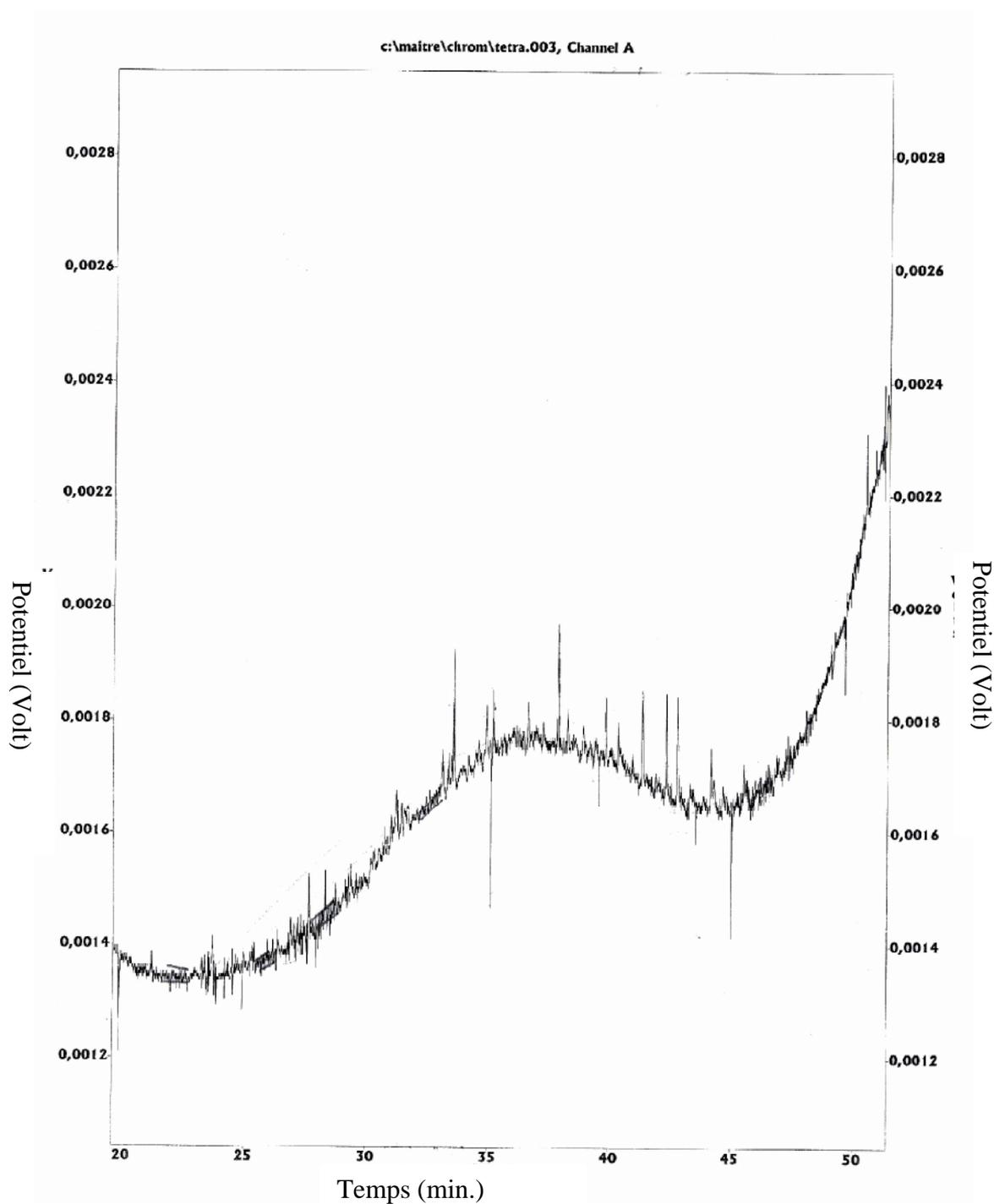
La possibilité de dégradation prioritaire des aromatiques simples peut expliquer dans notre cas les rendements de disparition semblables obtenus pour les C - H aromatiques entre le témoin et la biopile pendant la première phase (figure VI-5).

A la fin du traitement, une appréciation de la biodégradation du gasoil a été réalisée par CPG du dernier prélèvement à la surface (Figure VI-11). Une diminution notable des pics a été enregistrée par comparaison avec le profil obtenu par CPG du premier prélèvement (Figure VI-2). Cependant il reste quelques pics représentatifs des résidus complexes non dégradés.

## II-2 La Biopile B1 :

Pour pallier aux problèmes d'arrêt des compresseurs à l'échelle semi-pilote, nous avons lancé une petite installation (B1), munie d'un système d'aération simple constitué de pompes type aquarium. L'échantillon traité dans ce cas est le même sol contaminé après 7 mois d'atténuation naturelle soit à une concentration 5.8g/kg de sol. La biopile B1 est considérée comme un procédé de traitement indépendant. Cependant, il peut nous servir de confirmation à certains phénomènes observés dans la grande installation.

La Figures VI-12, illustrent le profil de biodégradation du gasoil dans la petite installation de biopile (B1) et témoin.



Colonne capillaire en silice fondue de 50m (0,32mm de diamètre interne et 0,40 $\mu$ m épaisseur du film), injecteur split (T= 315°C), détecteur FID (T= 325°C), température de la colonne : 35°C pendant 5mn puis programmation à 6°C/mn jusqu'à 310°C, gaz vecteur : hélium, 1,5ml/mn sortie colonne, quantité injectée : 0,6 $\mu$ l.

FigureVI-11 : Profil obtenu par CPG du gasoil en surface à la fin du traitement de la biopile B2

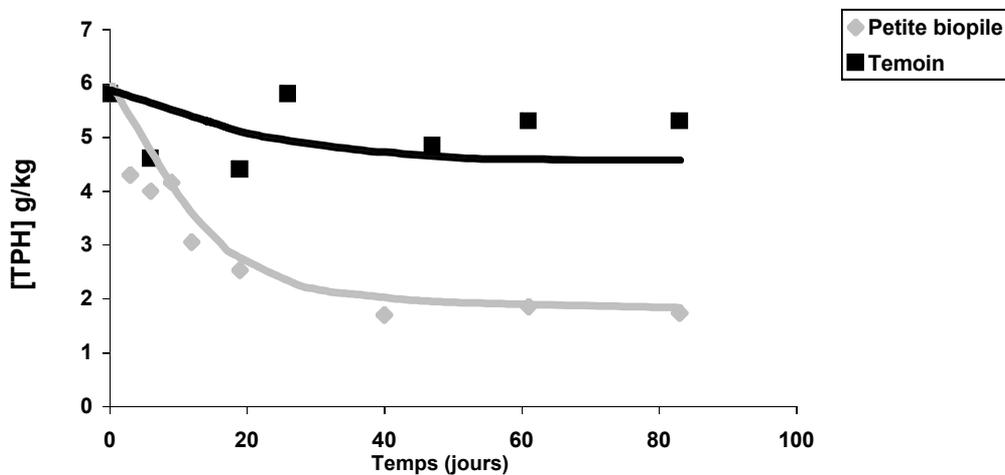


Figure VI-12 : Cinétique de biodégradation du gasoil dans la biopile B1 et le témoin

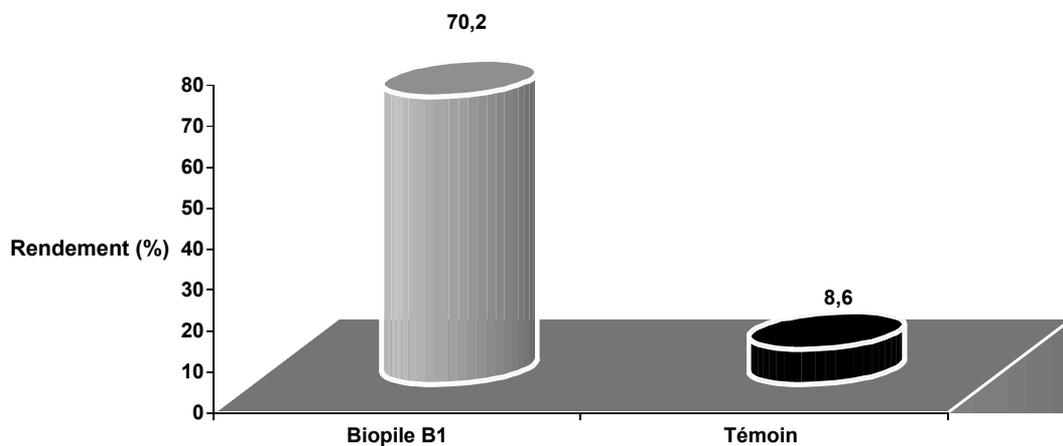


Figure VI-13 : Rendements d'élimination enregistrés pour la biopile B1 et le témoin à la fin du traitement

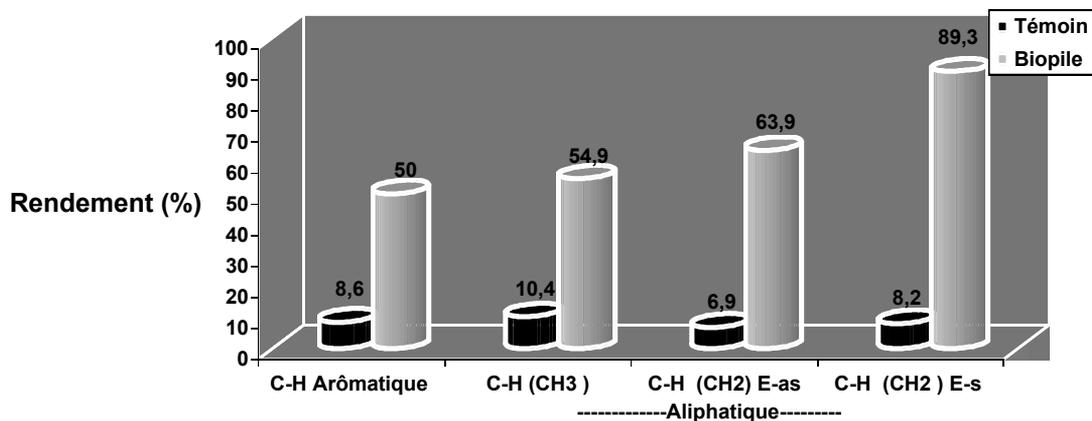


Figure VI-14 : Rendements de disparition des liaisons C-H appartenant aux hydrocarbures aliphatiques et aromatique du gasoil dans la biopile B1

Le témoin présente un déclin très lent de la concentration allant de 5.8g/kg à 5.3g/Kg (Figure VI-12) (Rendement : 8.6%) (Figure VI-13). Le profil de la biopile suit une cinétique exponentielle donnant une concentration finale de 1.73g/Kg (Figure VI-12) et donc un rendement de 70.2% (Figure VI-13). Le témoin dans cette biopile n'exprime pas un rendement appréciable par atténuation naturelle par rapport à la grande biopile. Ceci pourrait être dû au fait que la flore autochtone est moins active vis-à-vis des fractions complexes restantes du gasoil. Il faut rappeler qu'au niveau de la biopile les conditions d'aération, d'humidité et d'alimentation permettent à la flore disponible de se multiplier et de donner ainsi un rendement appréciable par rapport au témoin.

L'appréciation qualitative de la biodégradation (Figure VI-14 et Figure VI-15) permet de montrer que les liaisons touchées sont surtout à prédominance aliphatiques. Les hydrocarbures aromatiques sont des polluants complexes et donc dégradés moins efficacement.

### II-3 Paramètres de la cinétique de biodégradation du gasoil :

Les modèles cinétiques représentatifs de la biodégradation du gasoil dans la biopile B2, B1 et leurs témoins sont illustrés sur les figures VI-16, VI-17. Nous pouvons ainsi tirer les résultats suivants :

- La cinétique de biodégradation en surface est d'ordre (1) avec un coefficient de corrélation de 0.84 à 0.90. Yeung et Xu (1997), Namkoong et al (2002), Xu et Obbard (2004) ont obtenu une cinétique de même ordre au cours de leurs essais concernant les polluants suivants : pétrole, Diesel, fraction aromatique Arabian light respectivement.
- La cinétique de biodégradation en profondeur est d'ordre zéro avec un coefficient de corrélation de 0.95.
- Pendant la première phase de traitement, le témoin de la biopile B2 présente une dégradation notable (rendement de 50%) (Figure VI-4) selon une cinétique d'ordre un ( $R^2 = 0.9$ ). Cependant, pendant la deuxième phase de traitement, la dégradation est négligeable (5.4%) (Tableau VI-4), l'ordre de la réaction change. La concentration des TPH décroît lentement selon une cinétique considérée d'ordre pseudo nulle ( $R^2 = 0.14$ ).

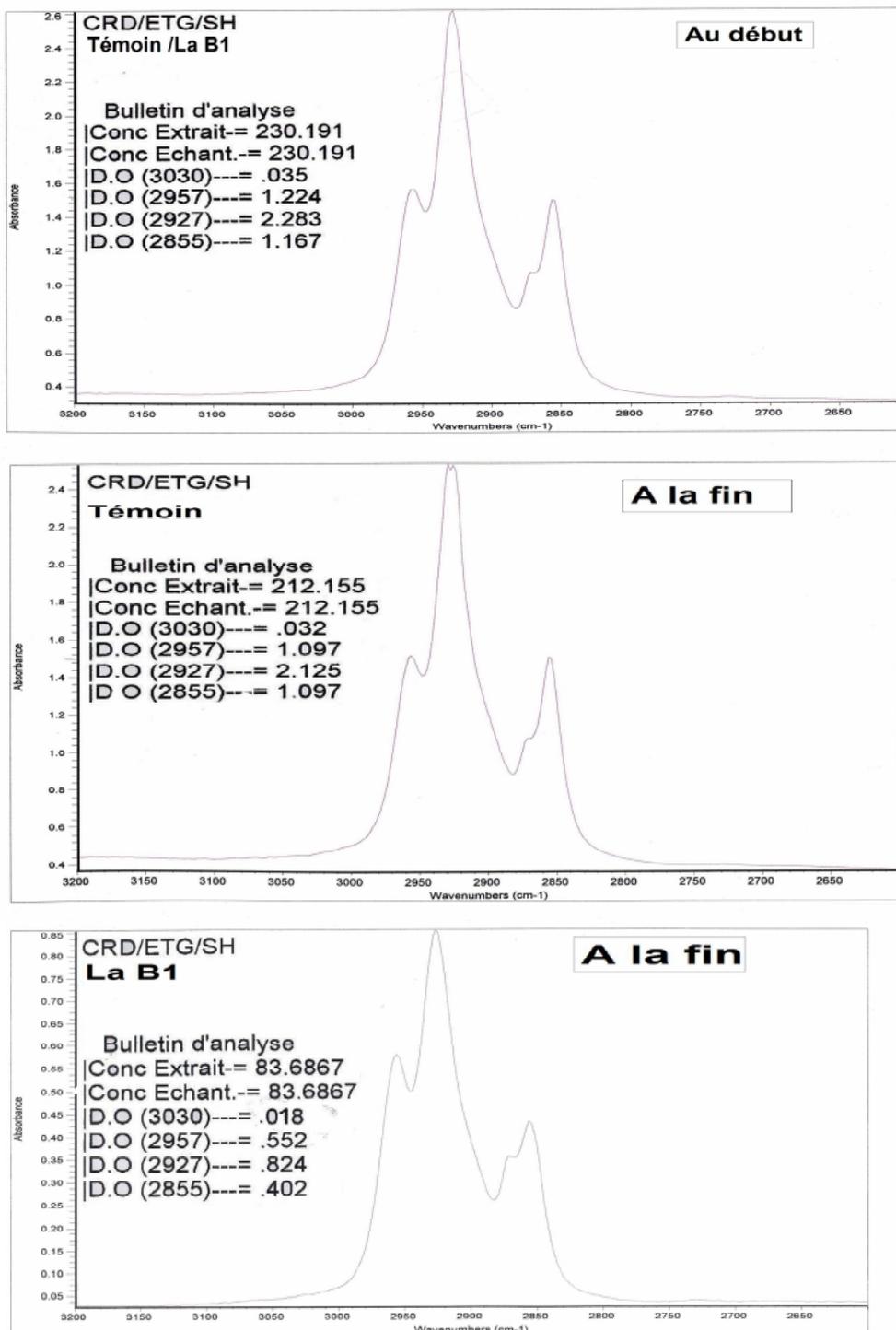
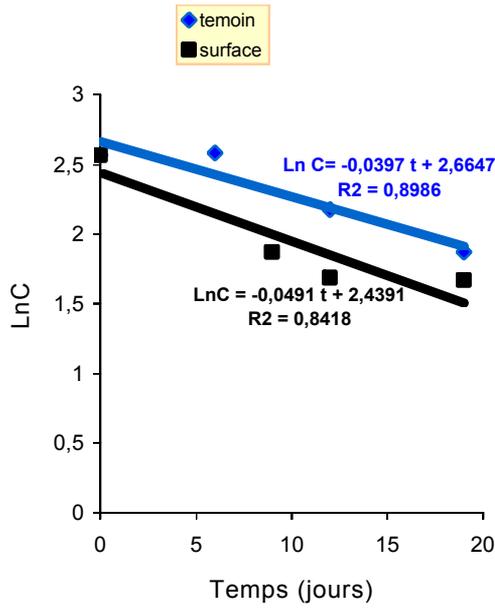
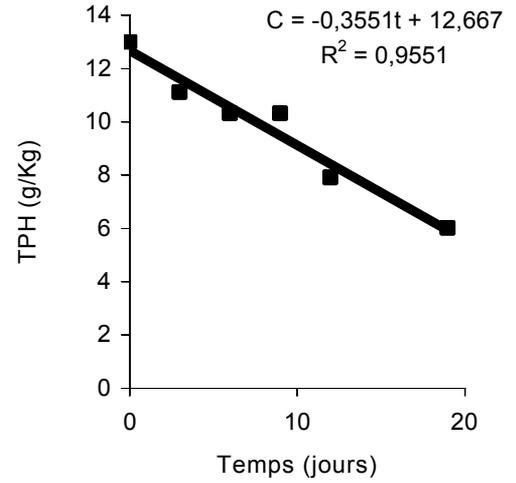


Figure VI-15: Spectres infrarouges enregistrés au début et à la fin de la Biopile B1

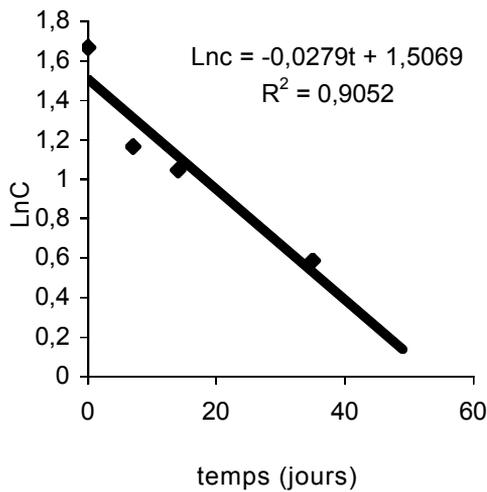
A: Grande installation B2- Phase 1



B : Grande installation B2 -phase 1 profondeur



C : Phase 2-Grande installation B2- surface



D : Grande installation -Phase 2

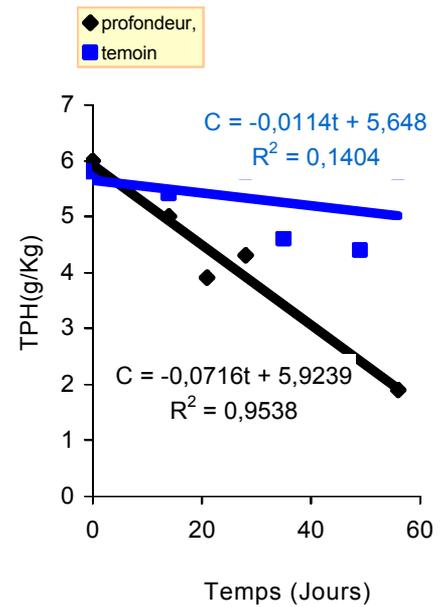


Figure VI-16: Modèles cinétiques représentatifs de la biodegradation du gasoil dans la grande installation B2

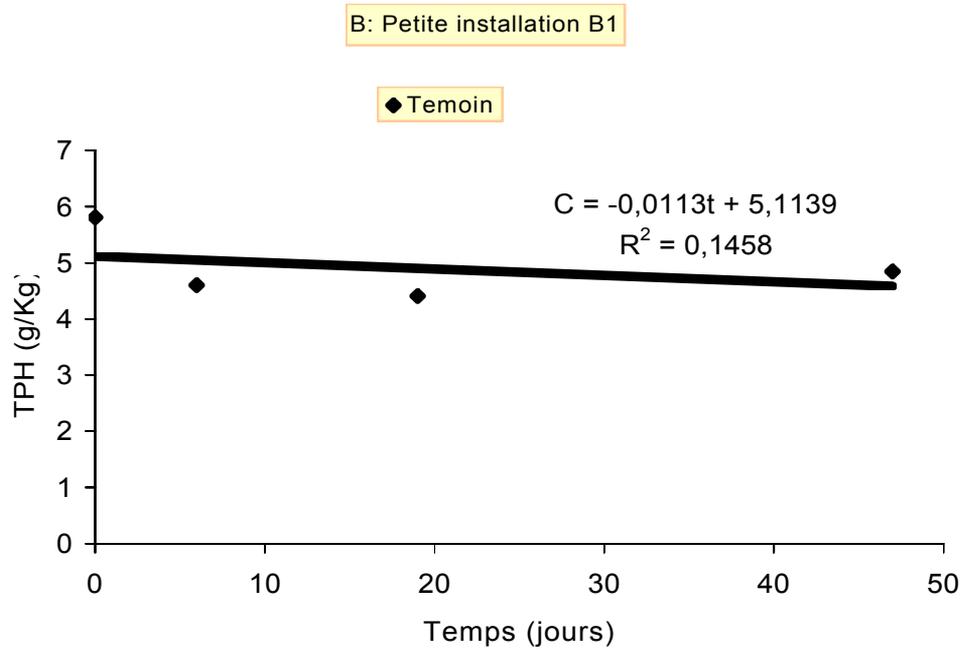
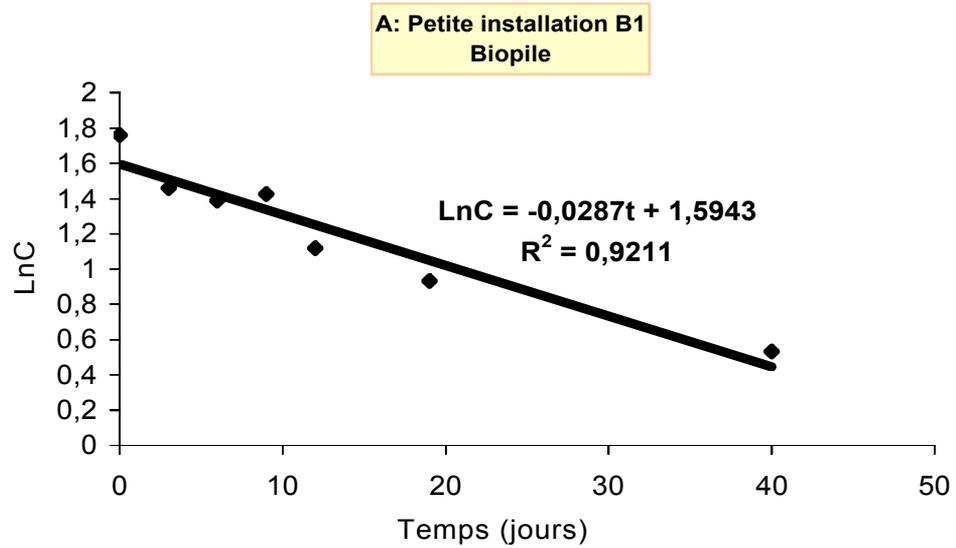


Figure VI-17: Modèles représentatifs de la biodegradation du gasoil dans la petite installation B1

- Au niveau de la biopile B1 : les notions de surface et de profondeur sont relatives vu la taille du dispositif et l'épaisseur réduite du sol à traiter. La biodégradation en biopile suit une réaction d'ordre (1) à  $R^2=0.92$ . Elle est donc semblable à celle trouvée à la surface de la grande installation.
- Le témoin de la petite installation présente un rendement de biodégradation assez faible (8.6%) (Figure VI-13). Le modèle de la réaction n'est pas clair. On le considère d'ordre pseudo-zéro à  $R^2= 0.15$ .

Les résultats de l'étude des cinétiques de biodégradation du gasoil sont représentés sur les tableaux VI-5 et VI-6.

Nous pouvons tirer les observations suivantes:

❖ Pour la première phase de traitement

- Le temps de demi-réaction est semblable pour le témoin et la profondeur (17 jours), Il faut rappeler que ces derniers ont des rendements de dégradation semblables (50% et 53%) (Figure VI-4). Le temps de demi-réaction à la surface est légèrement plus court (14jours) (Figure VI-4) traduisant un rendement d'élimination plus au moins important (59%).

Tableau VI-5: Paramètres cinétiques de la biodégradation du gasoil dans la biopile B2.

	Phase 1- Grande installation			Phase 2- Grande installation		
	Témoin	Profondeur	Surface	Témoin	Profondeur	Surface
Ordre	1	0	1	0 ( $R^2= 14\%$ )	0	1
Equation	$\ln C = 2.7 - 0.04 t$	$C = 12.7 - 0.36 t$	$\ln C = 2.4 - 0.05 t$	$C = 5.7 - 0.01 t$	$C = 5.9 - 0.07 t$	$\ln C = 1.5 - 0.03 t$
K	$0.04 J^{-1}$	$0.36 g.Kg^{-1}. J^{-1}$	$0.05 J^{-1}$	$0.01 g.Kg^{-1}.J^{-1}$	$0.07 g.Kg^{-1}. J^{-1}$	$0.03 J^{-1}$
$C_0$ (g/Kg)	14.4	12.7	11.5	5.7	5.9	4.5
$T_{1/2}$ ( J )	17.45	17.83	14.11	247.71	41.36	24.84

Tableau VI-6: Paramètres cinétiques de la biodégradation du gasoil dans la biopile B1.

Petite installation		
	Biopile	Témoin
Ordre	1	0 ( $R^2=14\%$ )
Equation	$\ln C = 1.6 - 0.029 t$	$C = 5,11 - 0.01 t$
K	$0.029 J^{-1}$	$0.01 g \cdot Kg^{-1} \cdot J^{-1}$
$C_0$ (g/Kg)	4.92	5,11
$T_{1/2}$ (J)	24.15	226,28

- En comparant les réactions de même ordre (surface et témoin), la constante de vitesse K est légèrement plus importante à la surface, exprimant une réaction un peu plus accélérée avec un temps de demi vie plus court.
  - Les concentrations initiales théoriques déterminées par ces modèles coïncident avec une moyenne de 12.83 g/Kg: concentration similaire à celle trouvée expérimentalement à  $t=0$  (13g/Kg).
- ❖ Pour la deuxième phase de traitement :
- Bien que la surface et la profondeur expriment des temps de demi-réaction différents (Tableau VI-5), les rendements obtenus à la fin du traitement sont les mêmes. Ceci est dû au fait que la biodégradation à la surface suit une cinétique rapide jusqu'à atteindre un palier (Figure VI-6). Ce palier peut être expliqué par :
    - ✓ Par le déclin de la viabilité cellulaire de la flore ce qui empêche l'obtention de concentrations plus faibles : Il faut rappeler qu'aux faibles concentrations en source d'énergie (TPH dans notre cas), la croissance s'arrête, certains microorganismes maintiennent leur vie sur la base des produits de l'autolyse des autres.
    - ✓ Par la résistance de certaines fractions complexes à la dégradation.
      - Le temps de demi-réaction du témoin est trop faible (247.71 jours) révélant une cinétique de biodégradation très lente, ce qui explique le rendement enregistré de 5.4% (Tableau VI-4).

- Le procédé de traitement en biopile réduit le temps de demi-réaction de 90% en surface et 83% en profondeur.
  - Les concentrations initiales théoriques de ces modèles sont proches de celles déterminées expérimentalement à  $t = 0_{\text{phase 2}}$  (5.8 g/Kg « témoin », 5.3 g/Kg « surface », 6 g/Kg « profondeur »)
- ❖ En comparant les deux phases : les constantes de vitesses et les temps de demi réactions sont en faveur de la prédominance de la première phase. La réaction de biodégradation est plus accélérée pendant la première phase (les constantes K sont plus grandes) donnant des temps de demi-réaction plus courts.
- ❖ La petite biopile confirme les résultats de la grande biopile, le temps de demi-réaction enregistré pour la biopile est nettement inférieur par rapport à celui obtenu pour le témoin, il est réduit de 89%.

### III- CINETIQUE DE CROISSANCE:

#### III-1 Grande installation (Biopile B2) :

Les résultats de la cinétique de croissance sont représentés sur les figures VI-18 et VI-19.

Il faut noter que pour la première phase de traitement, le témoin débute avec un nombre plus faible en microorganismes (bactéries, levure ou champignons) par rapport à celui de la biopile (figure VI-18). Ceci est dû au fait que le procédé a été enrichi avec une pré-culture obtenue à partir du même sol. Selon Ulfig et al (2001), l'enrichissement du sol avec l'inoculum a augmenté la pénétration des hydrocarbures du pétrole et une amélioration de la bioremédiation.

Dès le premier jour de traitement, nous avons noté une augmentation de la population bactérienne à la surface du procédé (entre J0 et J6) et au témoin (entre J0 et J3). A la profondeur, un début d'une phase exponentielle est enregistré à partir du 12<sup>ème</sup> jour (figure VI-18A). D'après Coulon et Delille (2003), l'amendement par l'engrais induit une augmentation significative du nombre des microorganismes.

Pour les levures, nous avons noté une absence totale dans l'échantillon témoin. En contrepartie, une augmentation importante a été remarquée au niveau de la biopile (surface

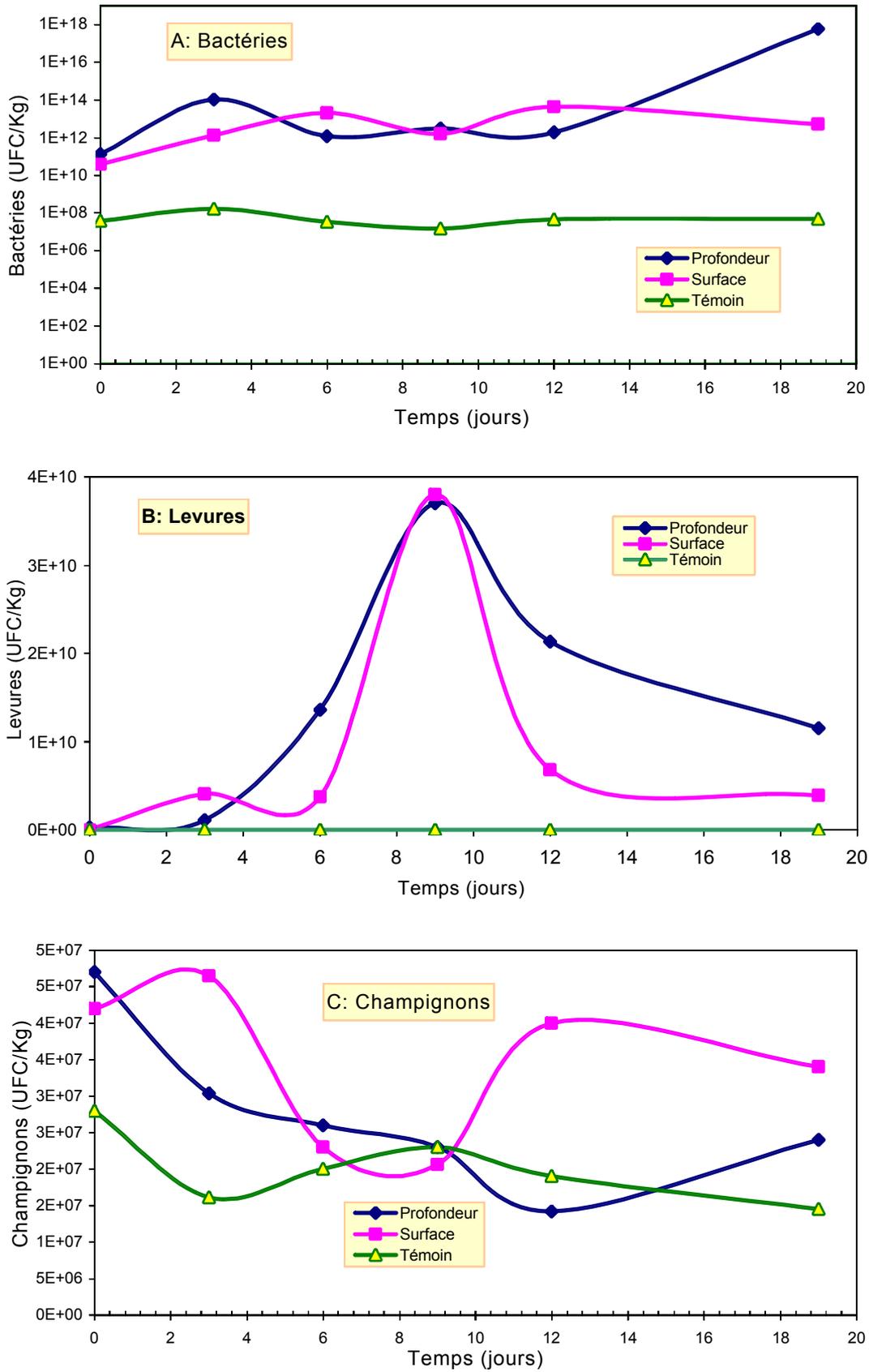


Figure VI- 18 : Cinétiques de croissance enregistrées au cours de la première phase de la grande installation

---

et profondeur) et ce entre J0 et J9 (figure VI-18B). Ce phénomène pourrait être attribué à la régénération des endospores au cours de la préculture grâce aux conditions favorables fournies (Agitation, suppléments nutritifs). Labrecque (2003) et Van Beilen et al (2003) ont évoqué la capacité des levures à dégrader les hydrocarbures.

Le nombre de la microflore fongique a légèrement diminué dès le premier jour de traitement (témoin, surface et profondeur) (figure VI-18C), ceci pourrait être dû soit :

- Aux conditions du milieu qui sont défavorables à leur croissance,
- à un effet inhibiteur des hydrocarbures à fortes concentrations ;
- à leur faible capacité de dégradation des hydrocarbures;
- ou à la prédominance des autres espèces microbiennes (bactéries et levures).

En conclusion, la première phase de traitement nous décrit un schéma de cométabolisme (synergie) entre les levures et un certain groupe bactérien pour la dégradation des fractions simples du gasoil (n- alcanes, certains aromatiques simples). Les levures commencent à dégrader les chaînes d'hydrocarbures, en les rendant plus facilement dégradables, à ce moment les bactéries interviennent pour terminer la dégradation. Lorsque ces fractions sont épuisées, on assiste à un déclin de la croissance des levures. Les champignons ne semblent pas avoir un rôle dans la biodégradation du gasoil. Plusieurs auteurs ont évoqué le phénomène du cométabolisme (Solano-Serena et al, 2001; Kanaly et Harayama, 2000 ; Vandecasteele et al, 2001; Marchal et al, 2003 ; Xu et Obbard, 2004).

La deuxième phase de traitement est caractérisée par une seconde phase de croissance pour les bactéries (à la surface et en profondeur) avec une phase exponentielle étendue sur 35 jours (figure VI-19A). Ceci nous laisse penser que les fractions dégradées pendant cette phase sont plus complexes. Cette phase pourrait être caractéristique de la dégradation des hydrocarbures branchés et des aromatiques complexes.

Une deuxième période de croissance des levures en profondeur a été enregistrée dès le premier jour de la remise en marche (figure VI-19B). Il en est de même pour les champignons (figure VI-19C). A la surface un nombre moyen est maintenu pour les deux populations résultant de plusieurs phases de croissance et de déclin. Cette différence de croissance entre la surface et la profondeur pourrait être due à l'infiltration des produits de

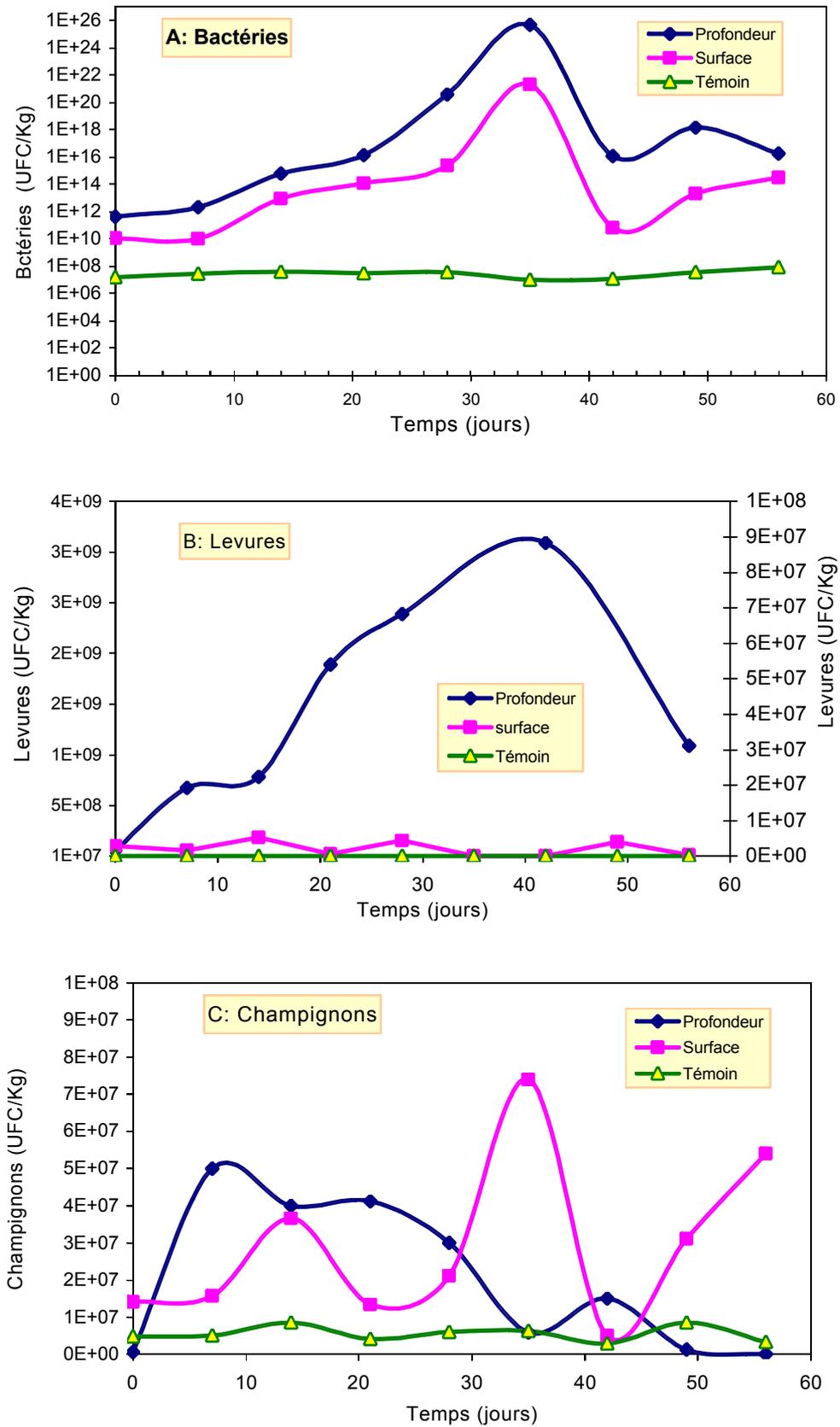


Figure VI-19: Cinétiques de croissance enregistrées au cours de la seconde phase de la grande installation

dégradation libérés par les bactéries vers le fond de la biopile. Ce phénomène confirme que la croissance inhibée des champignons pendant la première phase pourrait être due à leur faible potentiel de dégradation.

L'hypothèse émise concernant l'effet inhibiteur des hydrocarbures à fortes concentrations peut être aussi évoquée dans ce cas puisque la croissance des champignons n'a débuté qu'à partir d'une concentration en TPH de 6g/Kg de sol (Figure VI-6). Nous pouvons trancher sur cette dernière hypothèse en observant le phénomène qui s'est déroulé au niveau de la petite biopile sachant que cette dernière a débuté à partir d'une concentration basse de 5,8g/Kg de sol.

### III-2 Petite installation (Biopile B1) :

Les résultats de la cinétique de croissance sont représentés sur les figures VI-20.

Par comparaison avec la grande installation, des phénomènes identiques ont été enregistrés dans la petite installation confirmant ainsi nos hypothèses :

- Deux phases de croissance différentes des bactéries ont été observées (figure VI-20A), il y a une co-multiplication des levures pendant la première phase de croissance des bactéries (figure VI-20B): le phénomène de synergie se confirme : un premier groupe bactérien est responsable avec les levures de la dégradation des fraction simples du gasoil.

A l'épuisement de ces fractions, le déclin est enregistré pour les deux populations microbiennes. A ce moment, un autre groupe bactérien dont la phase de latence était pendant la première phase de croissance- intervient dans la biodégradation des hydrocarbures complexes. S'il s'agissait de la même catégorie bactérienne, la deuxième phase exponentielle serait une suite de la phase stationnaire de la première croissance.

- Les champignons suivent le même schéma de croissance que celui de la grande bio pile : la flore fongique diminue progressivement jusqu'à disparition totale au 19<sup>ème</sup> jour. Sa croissance se relance de nouveau à partir du 33<sup>ème</sup> jour (figure VI-20C). Il faut noter que la petite biopile a démarré à partir d'une concentration basse de 5,8g/Kg de sol (figure VI-12) et pourtant le phénomène d'inhibition de la croissance est apparu.

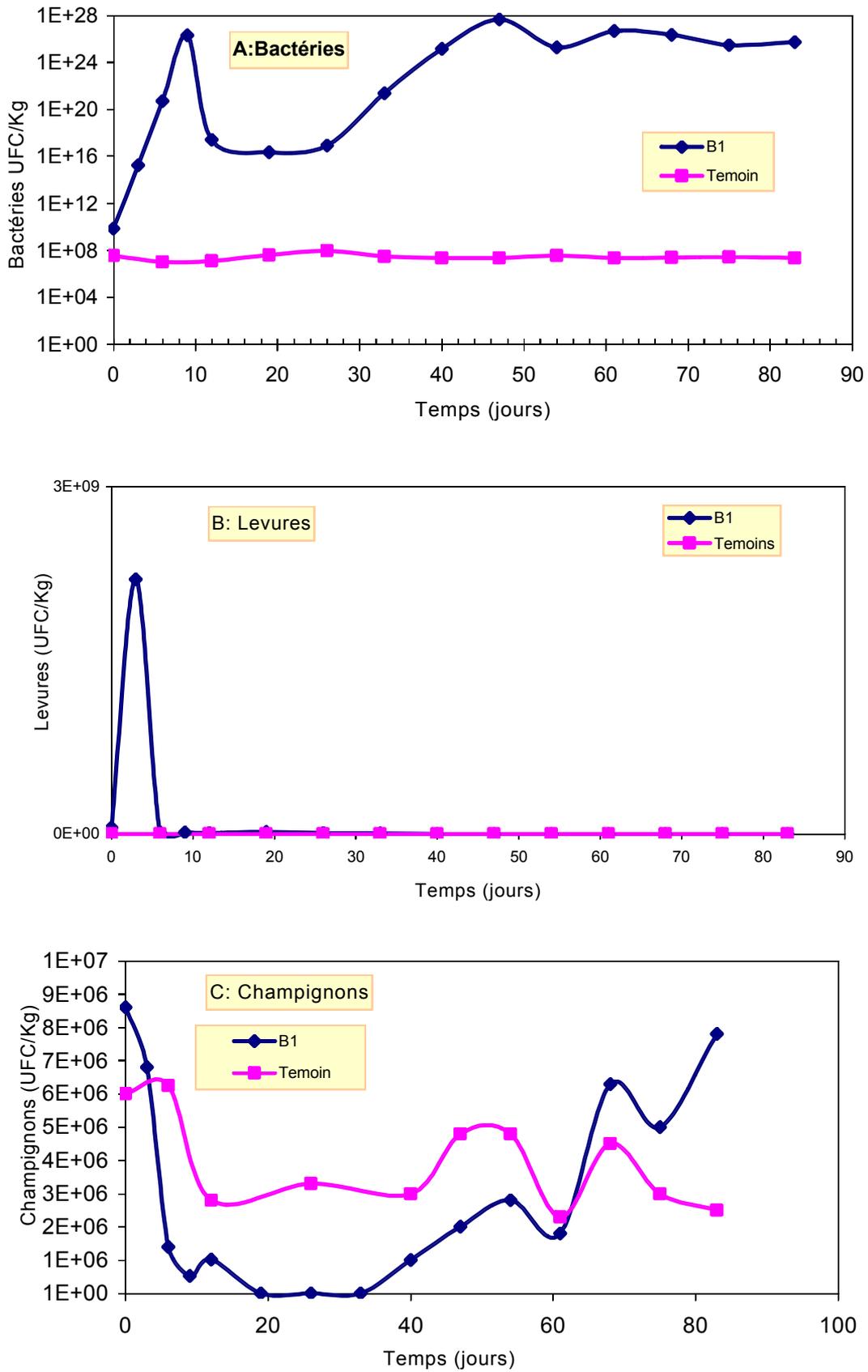


Figure VI-20 : Cinétiques de croissance enregistrées dans la petite installation B1

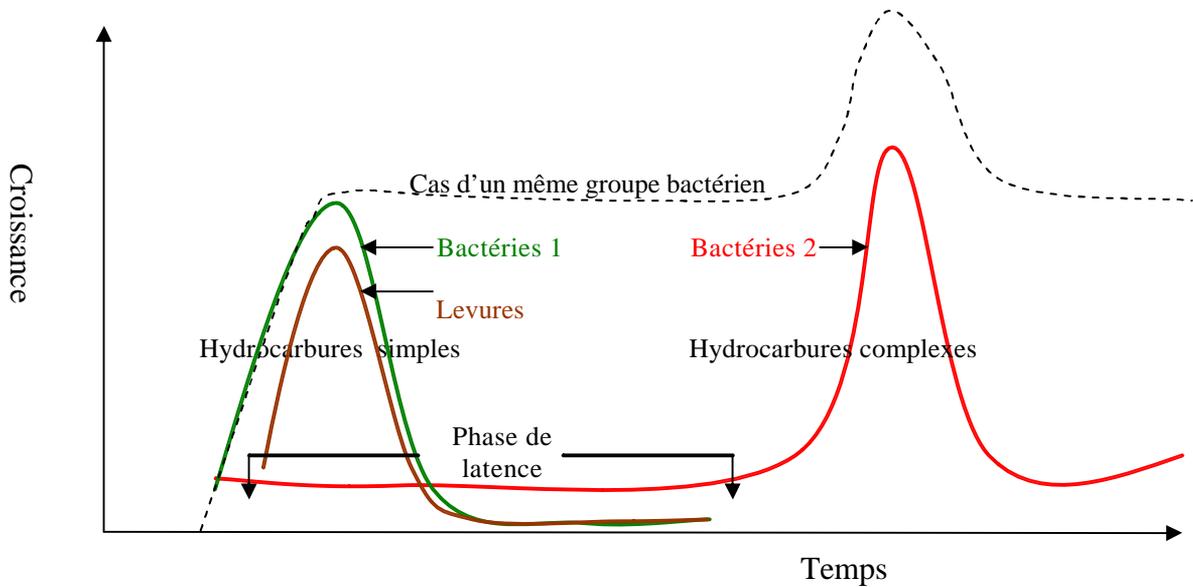


Schéma N°A : Schéma éventuel de croissance des microorganismes au cours du traitement par biopile

A forte concentration les hydrocarbures n'exercent donc pas un effet inhibiteur sur la croissance des champignons mais c'est l'incapacité de cette flore à dégrader les hydrocarbures qui est responsable de leur disparition, la preuve que leur croissance est capable de relancer dès qu'il y a libération suffisantes des produits de la biodégradation grâce au phénomène de co-métabolisme entre les bactéries et les levures. En comparant avec le témoin, le nombre des champignons diminue mais ne s'annule pas; ce qui nous laisse penser qu'en plus du faible potentiel de dégradation, le milieu devient défavorable à leur survie. Ceci peut être dû à la libération de métabolites intermédiaires inhibiteurs au cours de la biodégradation exercée par l'ensemble des bactéries et levures, après épuisement de ces métabolites, on assiste à un démarrage de la croissance au dépend des produits finaux de la biodégradation.

- La petite biopile nous confirme une fois de plus que les champignons ne jouent pas dans notre cas un rôle dans la biodégradation du gasoil puisque leur croissance n'est significative qu'à partir du 33<sup>ème</sup> jour où le palier de la biodégradation est presque atteint (figure VI-12).

### III-3 Paramètres de la croissance :

Les paramètres de la croissance sont calculés selon la méthode utilisée par Liwarska-Bizukojc et al (2001). L'expression mathématique de la croissance est :

$$\ln (X/X_0)=\mu t \ln 2$$

$$X/X_0= e^{\mu t \ln 2}$$

$$X=X_0. e^{\mu t \ln 2}$$

$$X=X_0 e^{\mu' t}$$

Où on considère :  $\mu'$  est le taux de croissance =  $\mu \cdot \ln 2 / G$ . G est temps de génération.

En traçant la phase exponentielle d'une courbe de croissance à l'échelle logarithmique nous pouvons avoir une courbe de tendance d'équation  $X=X_0 e^{\mu' t}$ .

D'une autre façon le traçage de  $\ln X$  en fonction de « t » nous donne une phase exponentielle d'équation  $\ln X= \mu' t + \ln X_0$ .

Selon Liwarska-Bizukojc et al (2001),  $\mu'$  est considéré dans ce cas comme  $\mu_{\max}$  puisque la phase stationnaire est atteinte.

A partir des phases exponentielles représentées sur les figures VI-21 à VI-28, nous pouvons tirer les  $\mu_{\max}$  correspondant à chaque phase de croissance significative et ce pour toutes les populations microbiennes (bactéries, champignons ou levures)(Tableau VI-7,VI-8).

Tableau VI-7 : Résumé des  $\mu_{\max}$  de la grande biopile B2.

	Phase 1- Grande installation			Phase 2- Grande installation		
	Témoin	Profondeur	Surface	Témoin	Profondeur	Surface
$\mu_{\max}$ (Bactéries) $j^{-1}$	0,49	1,32	1,04	0,063	1,07	0,82
$\mu_{\max}$ (Levures) $j^{-1}$	/	0,56	0,76	/	0,081	/
	(Levure -)			(Levure -)		(Stable)
$\mu_{\max}$ (Champignons) $j^{-1}$	/	/	/	/	0,64	/
	(Declin)	(Declin)	(Declin)	(Declin)		(Stable)

(Levure -) : absences des levures

Tableau VI-8 : Résumé des  $\mu_{\max}$  de la petite biopile B1.

	Petite installation		
	Témoin	Biopile	
$\mu_{\max}$ (Bactéries) $j^{-1}$	0,14	Croissance I : 4,21	Croissance II : 1,19
$\mu_{\max}$ (Levures) $j^{-1}$	/ (Levure -)	1,22	
$\mu_{\max}$ (Champignons) $j^{-1}$	/ (Declin)	0,044	

Le calcul des  $\mu_{\max}$  nous révèle que la population microbienne développée au cours de la dégradation des hydrocarbures est à prédominance bactérienne. Les taux de croissance observés pour les bactéries sont supérieurs à ceux des levures et des champignons.

Les taux de croissance des levures sont inférieurs à ceux des bactéries mais cela n'exclut point leur rôle synergique dans le déroulement de la biodégradation. La croissance des levures est relativement lente par rapport aux bactéries, ce constat a été signalé aussi par Labrecque (2003) qui indique que. Les champignons manifestent soit un déclin ou une croissance à la fin du procédé, ce qui exclue leur rôle dans la dégradation du gasoil.

En comparant les deux phases nous constatons que les taux de croissance des bactéries enregistrés pendant la deuxième phase sont inférieurs à ceux de la première phase révélant le degré de complexité des fraction biodégradées à la fin du traitement.

#### Conclusion :

Le suivi associé de la dégradation et la croissance nous permet de tirer les points suivants :

- ❖ L'aération est un facteur critique dans la biodégradation des hydrocarbures ;
- ❖ L'élimination des TPH se fait en grande partie au cours des vingt premiers jours;
- ❖ Les fractions simples ont été dégradées en premier lieu suivies des fractions complexes
- ❖ La microflore responsable de la biodégradation est à prédominance de la population bactérienne ;
- ❖ Une Synergie a été enregistrée entre les levures et les bactéries pour la biodégradation du gasoil, il s'agit du phénomène de cométabolisme ;
- ❖ Dans le cas de cette présente étude, les champignons ne semblent pas jouer un rôle dans la biodégradation du gasoil.

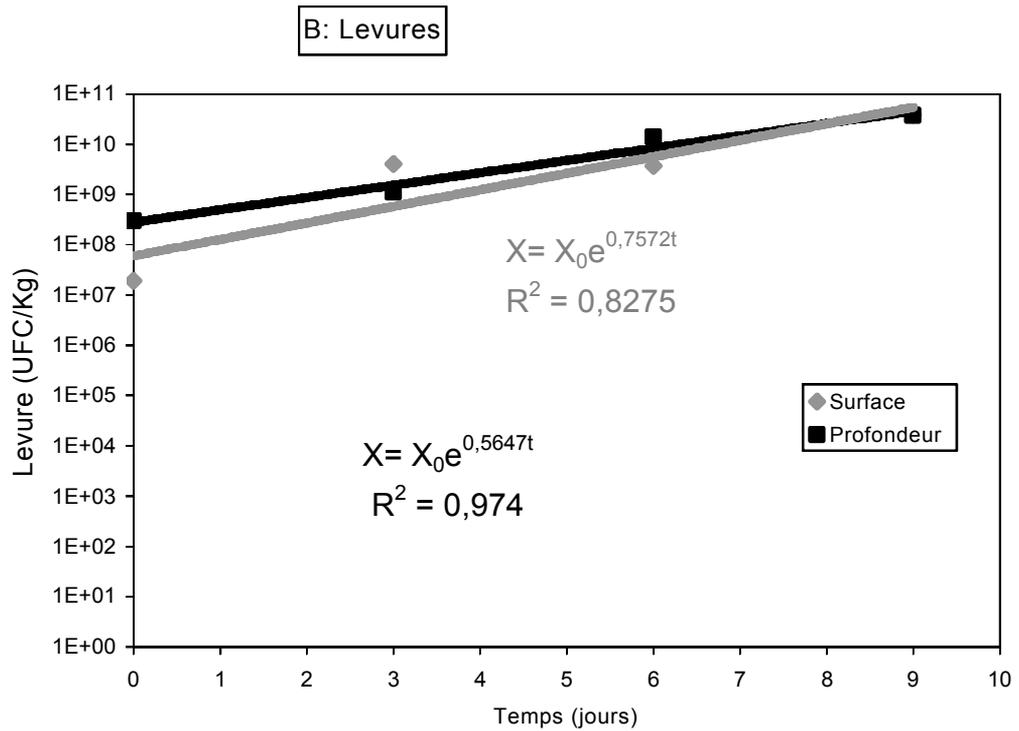
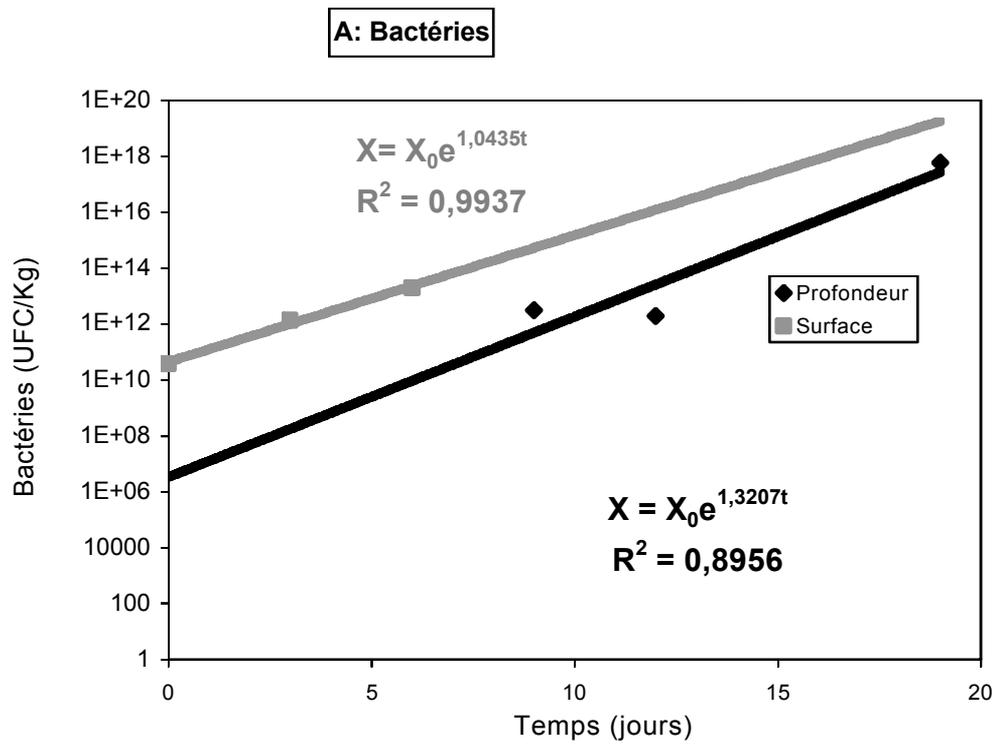
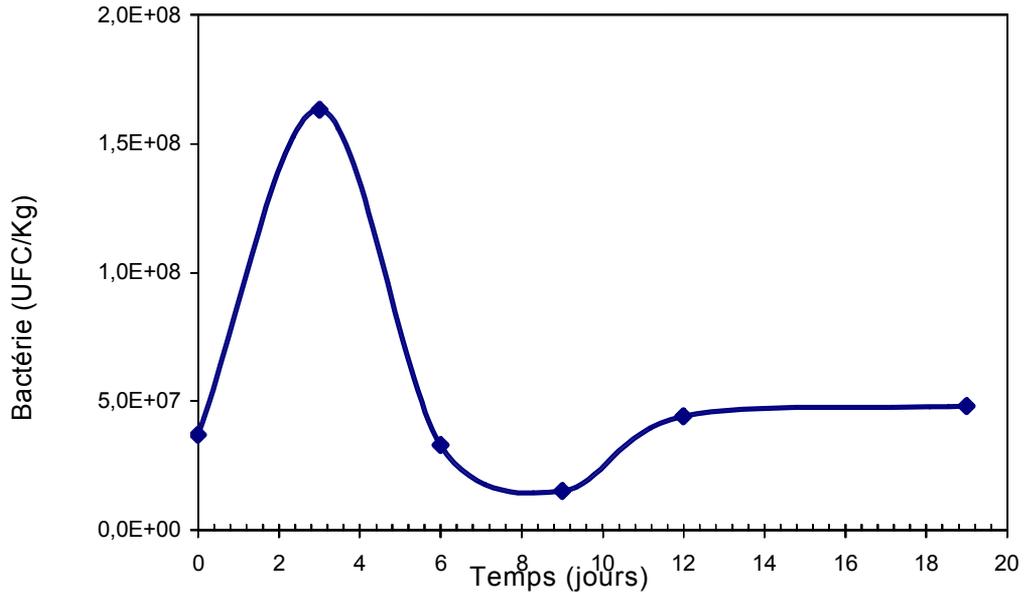


Figure VI- 21 : Grande installation, Phase I de traitement:  
Phases exponentielles des bactéries et levures

A: Cinétique de croissance des bactéries du témoin de la biopile B2 pendant la première phase



B: Phase exponentielle des bactérie du témoin

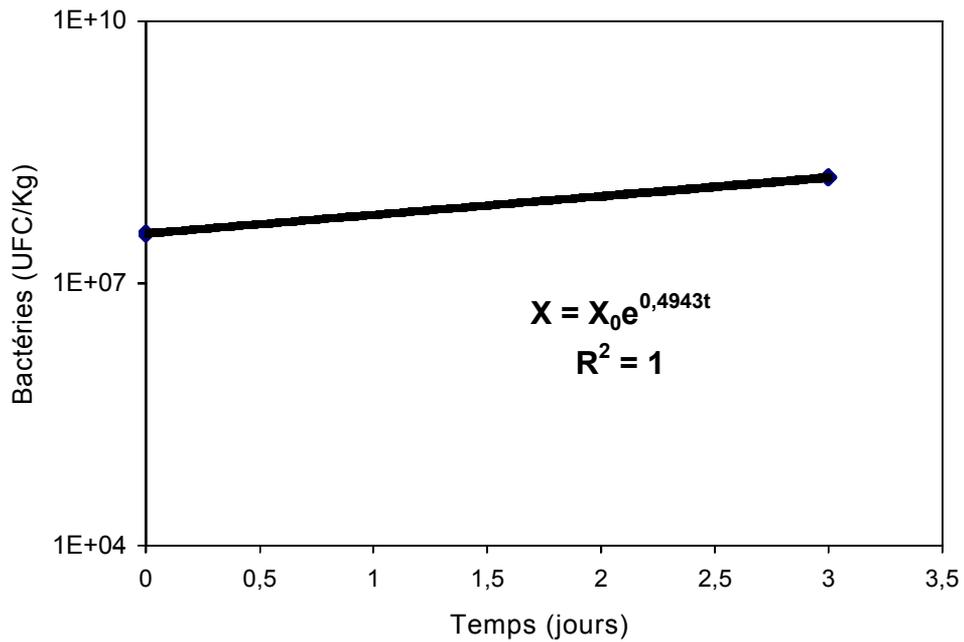


Figure VI- 22 : Grande installation, Phase I de traitement: croissance des bactéries du témoin

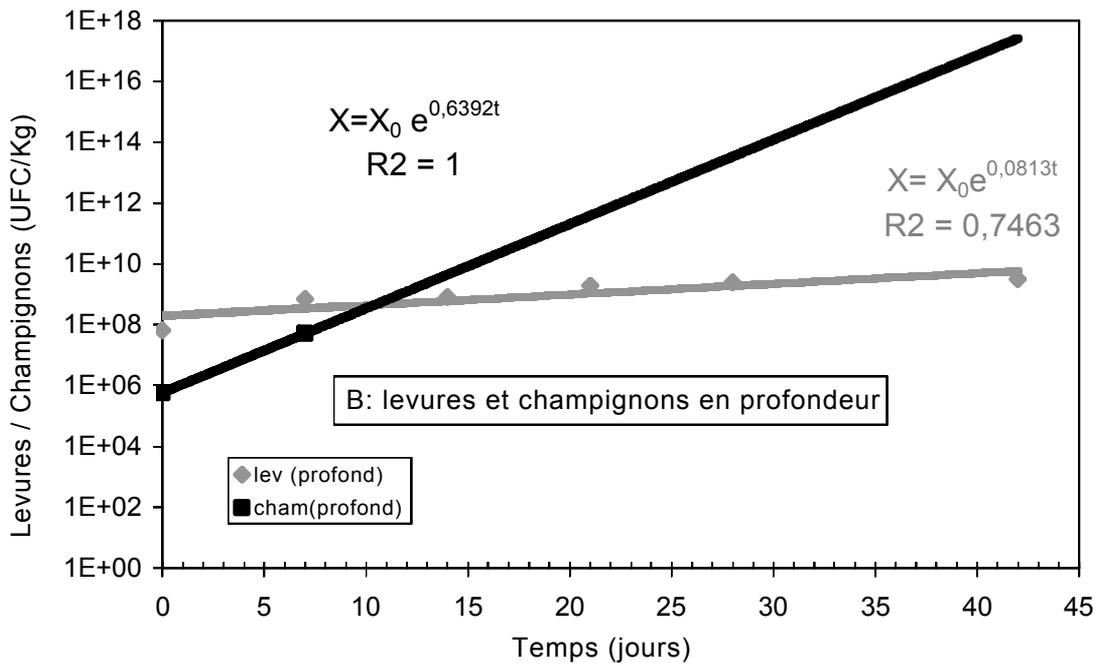
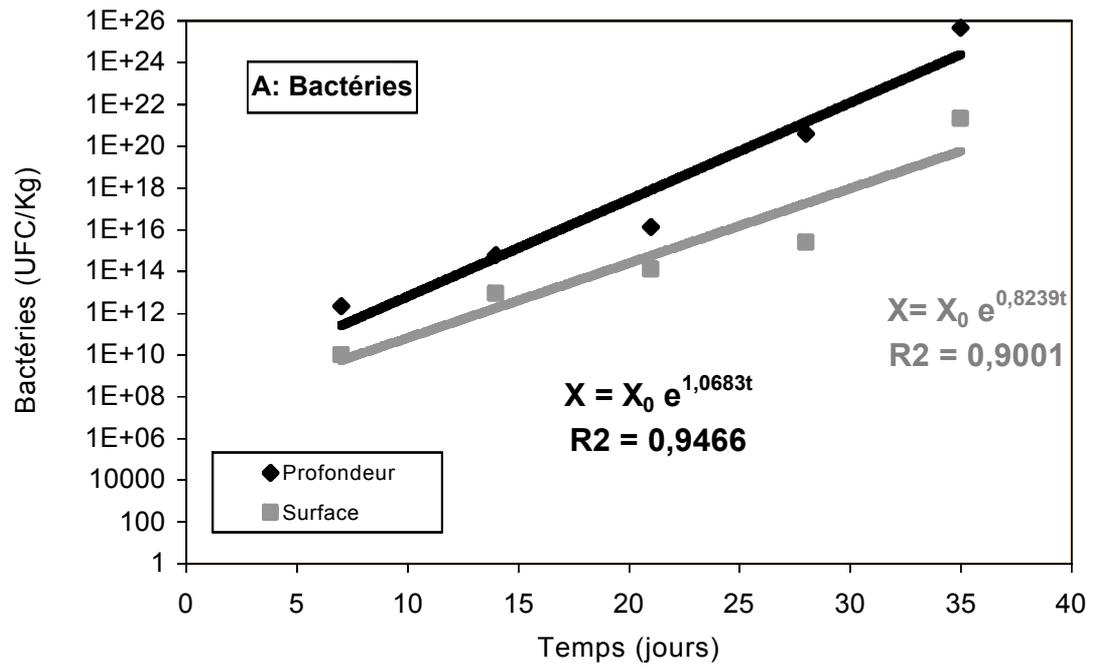
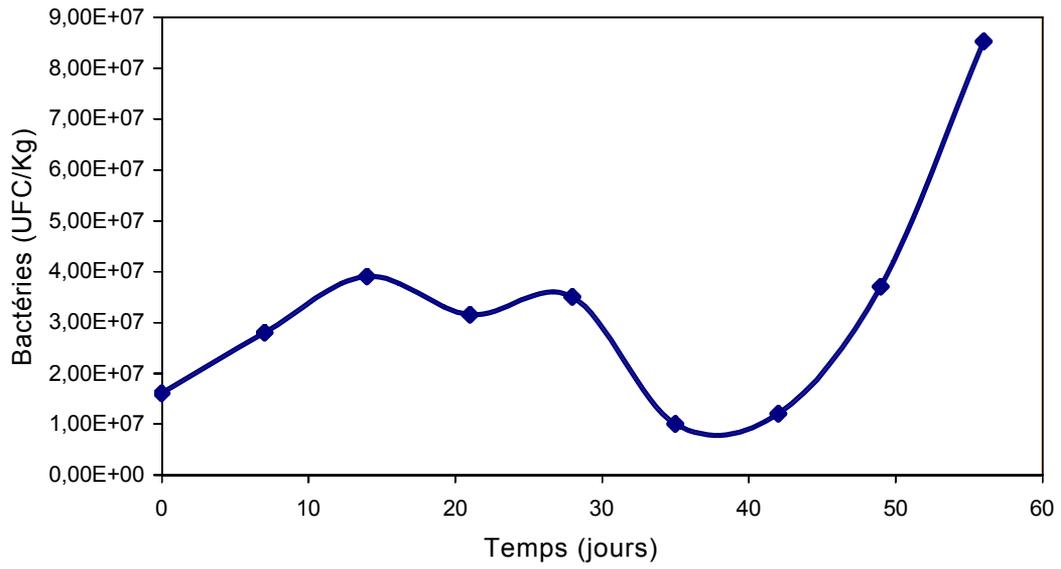


Figure VI- 23 : Grande installation, Phase II de traitement:  
 Phases exponentielles des bactéries, champignons et levures

A: Cinétique de la croissance des bactéries du témoin de la biopile B2 pendant la deuxième phase



B: Phase exponentielle des bactéries au témoin

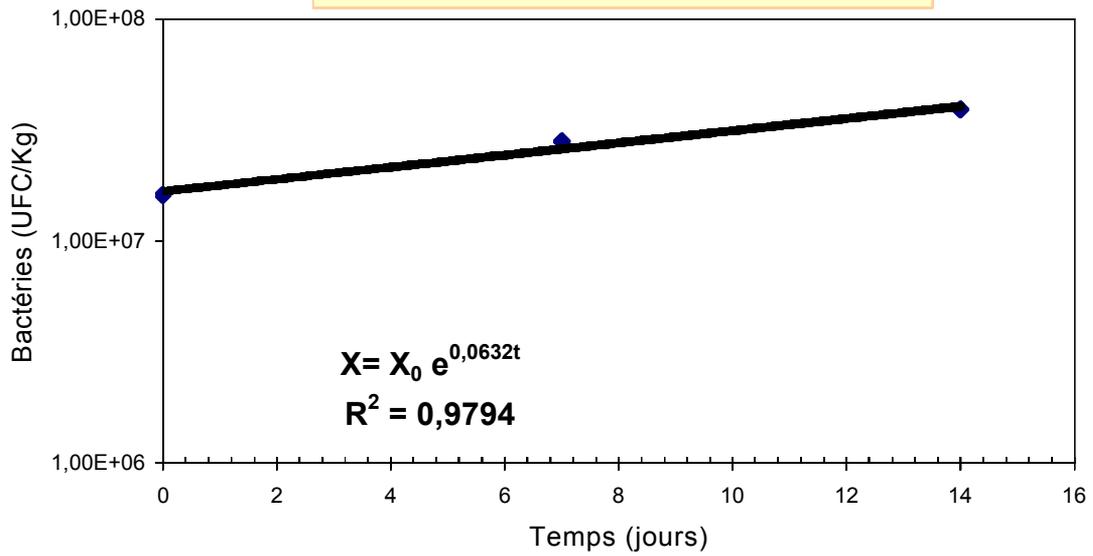
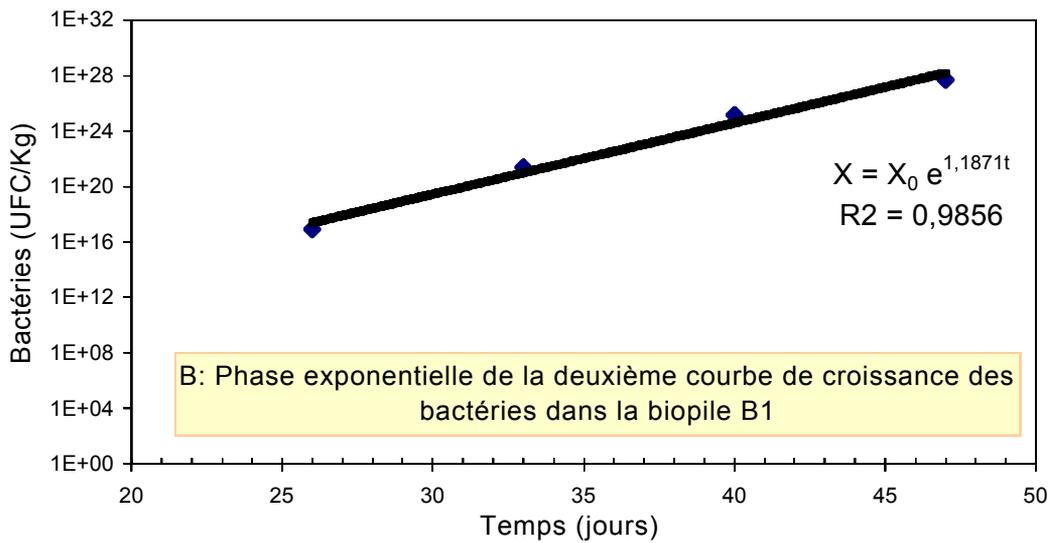
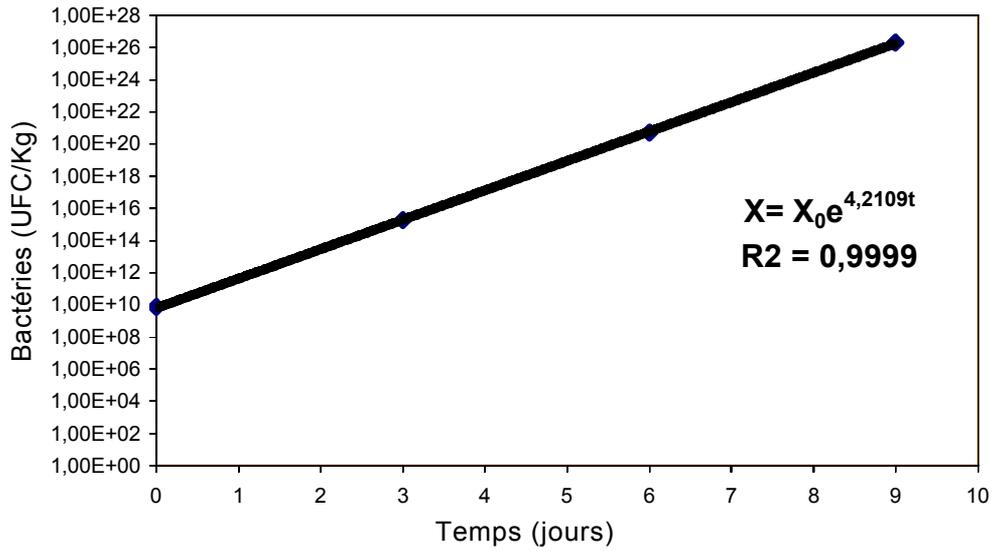


Figure VI- 24 : Grande installation, Phase II de traitement: croissance des bactéries du témoin

**A: Phase exponentielle de la première courbe de croissance des bactéries dans la biopile B1**



**B: Phase exponentielle de la deuxième courbe de croissance des bactéries dans la biopile B1**

Figure VI- 25 : Phases exponentielles des bactéries dans la petite installation B1

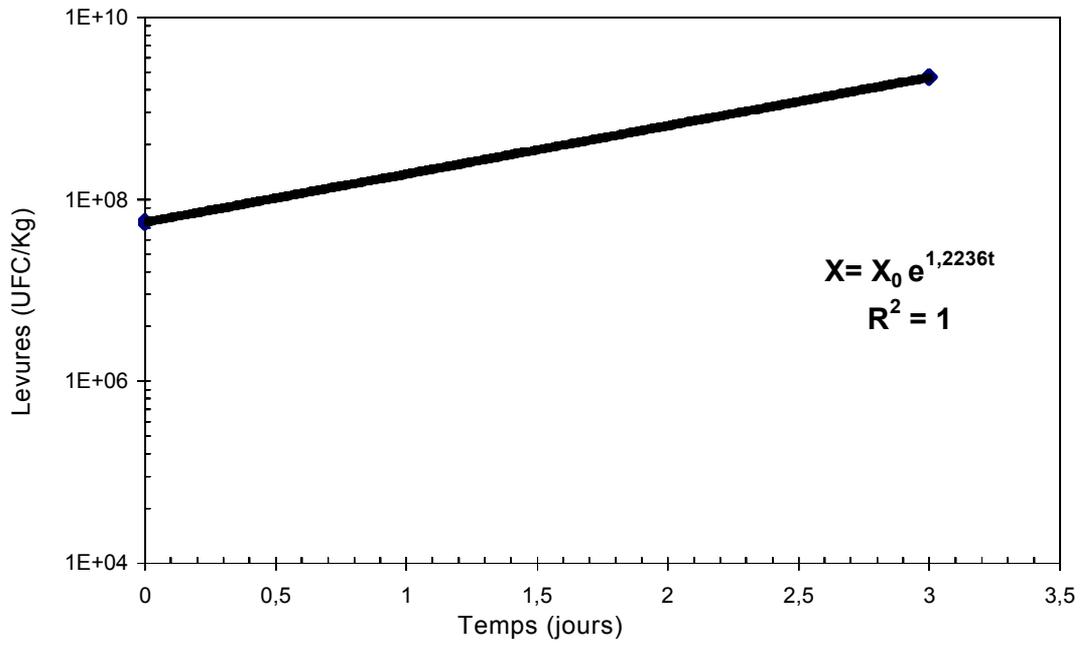


Figure VI- 26 : Phase exponentielle des levures dans la biopile B1

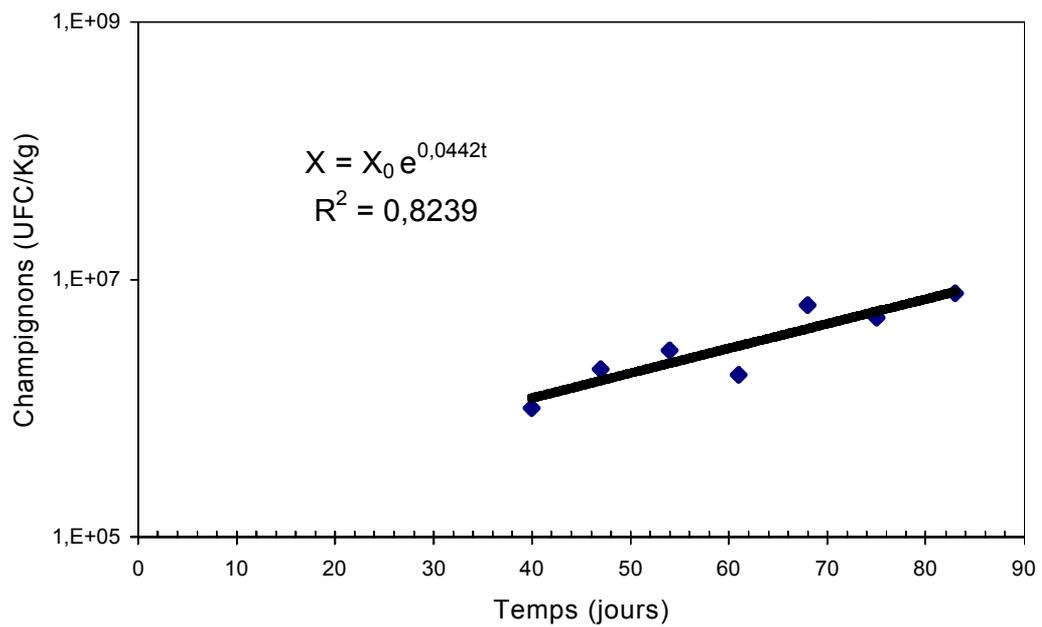


Figure VI -27 : Phase exponentielle des champignons dans la biopile B1

**A: Cinétique de croissance des bactéries dans le témoin de la biopile B1**

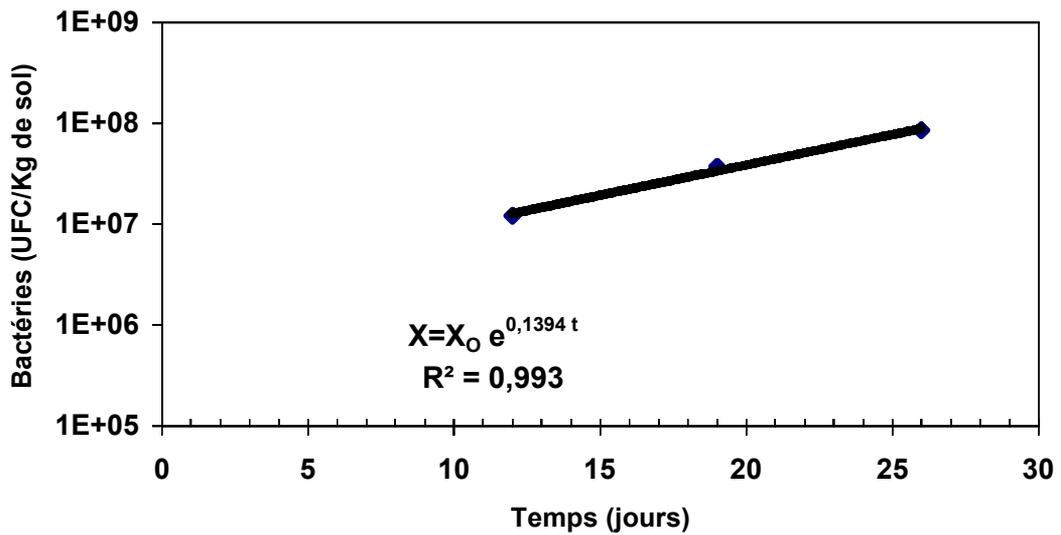
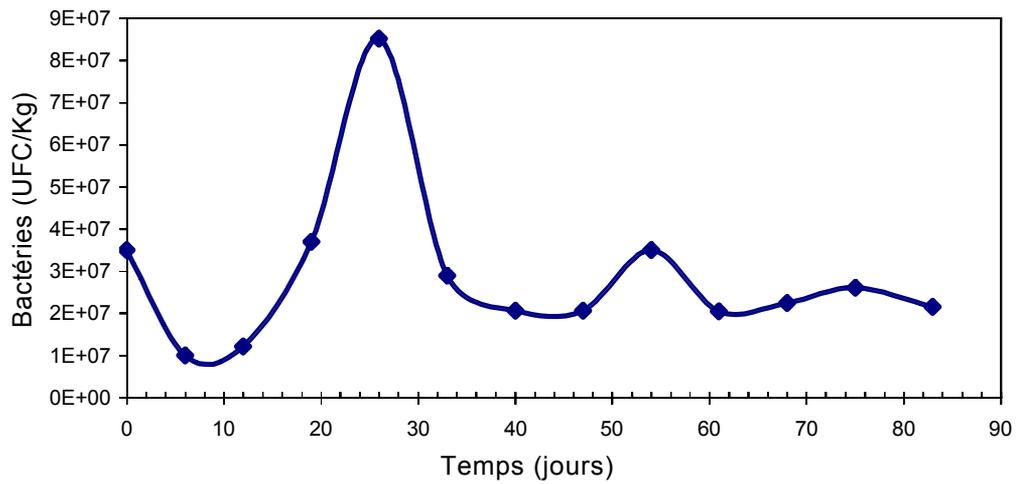


Figure VI- 28 : Petite installation B1 : croissance du témoin

---

#### IV. EVOLUTION DES PARAMETRES CHIMIQUES AU COURS DU TRAITEMENT

Afin de mieux comprendre les phénomènes qui accompagnent la biodégradation du gasoil et le comportement des microorganismes, nous avons choisi de suivre l'évolution de certains paramètres : pH, phosphore, azote totale,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et enfin le carbone organique.

##### IV.1- Evolution du pH

L'évolution du pH en fonction du temps est présentée sur la figure VI-29. Au début de la biodégradation du gasoil, le pH du sol était de 8,5 pour la biopile B1, 8,4 à la surface de la biopile B2 et 8,1 en profondeur de la biopile B2. Ces valeurs restent dans les limites fixées pour une meilleure biodégradation des hydrocarbures, Selon Ballerini (1999) le pH du milieu peut affecter l'activité microbienne. La plupart des bactéries sont capables de se développer dans un intervalle de pH allant de 5 à 9, avec un optimum se situant aux alentours de pH 7.

Au cours du traitement, le pH diminue durant la première semaine puis se stabilise à des valeurs proches de la neutralité, par contre le pH reste stable dans le témoin malgré la diminution des TPH, Margesin et Schinner (2001) ont observé une diminution de manière significative du pH dans les sols fertilisés pendant les 22 premiers jours d'étude. Cette baisse de pH qui tend vers la neutralité indique la présence d'une activité microbienne accrue dans les sols traités par la biopile par rapport au témoin. Cela pourrait être dû aux différentes réactions biochimiques qui entraînent l'assimilation des composés du gasoil et la synthèse des acides gras qui doivent leurs acidités à ces groupements « COOH ». Ces derniers sont des métabolites intermédiaires de la biodégradation des hydrocarbures avant la minéralisation complète par les microorganismes. L'oxydation des n-alcanes en acides gras a été citée par Whyte et al (1998), Abed et al (2002), van Beilen et al (2003). En effet, il a été observé que durant la dégradation, par exemple, le xylène, il y a production d'acides intermédiaires acidifiant ainsi le milieu (Labrecque, 2003).

Un autre paramètre responsable de la décroissance du pH est la production des nitrates suite à l'assimilation de l'ammoniac par le phénomène de la nitrification (rappelant que les sols traités dans les biopiles B1 et B2 sont enrichis par l'urée, utilisé comme source d'azote pour la croissance de la microflore).

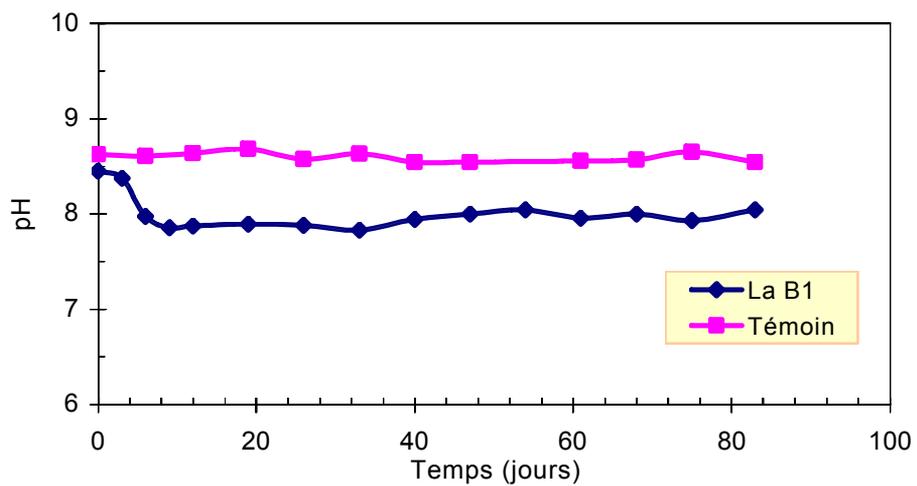
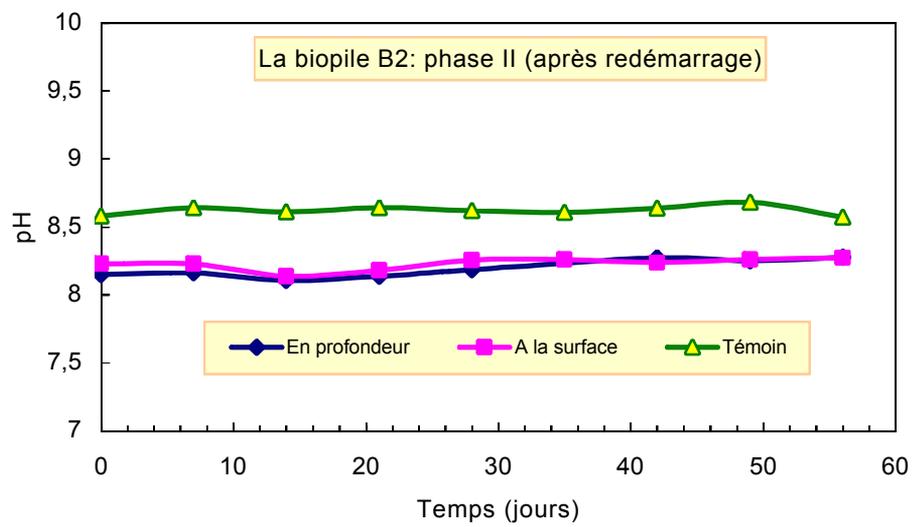
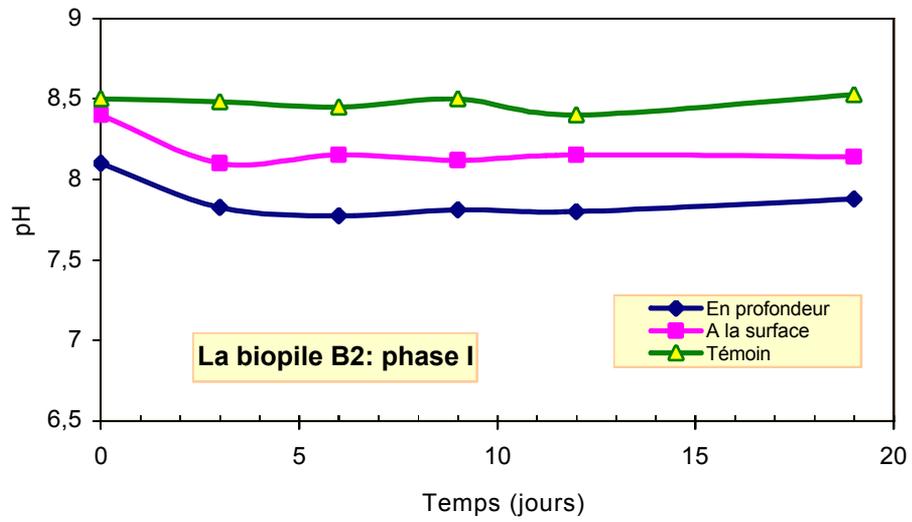
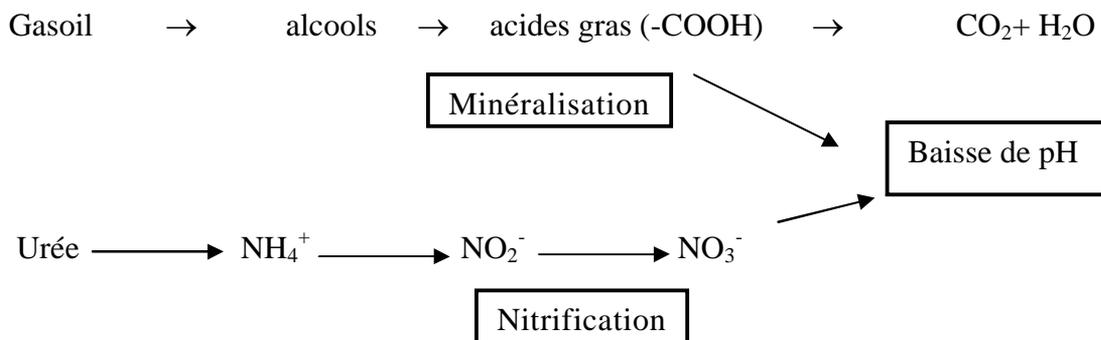


Figure VI-29: Evolution du pH au cours du traitement par les biopiles et les témoins

Dans une étude effectuée par Margesin et Schinner (2001), ces auteurs ont évoqué la diminution du pH par la biostimulation. L'hydrolyse de l'urée conduit à la formation de l'ammoniac entraînant normalement une augmentation du pH, mais cette élévation est contrebalancée par l'activité de la microflore nitrifiante (formation de nitrates sous forme de  $\text{HNO}_3$ ) et la libération des acides gras d'où la stabilité du pH.

Notons, que la réduction des pH n'est que passagère, car les nitrates et les acides gras sont eux-mêmes très rapidement assimilés par les microorganismes : à la fin du traitement nous avons noté une légère élévation du pH (8,3 en profondeur et à la surface de la biopile B2 et 8,04 dans la biopile B1), ceci est aussi probablement dû à l'arrêt de la dégradation du gasoil et donc l'arrêt de la libération des acides gras dans le sol.

Selon Davet (1996), les microorganismes peuvent modifier le pH du sol soit en acidifiant le milieu (nitrification, synthèse d'acides organiques) soit en alcalisant le milieu (hydrolyse des protéines et des composés organiques azotés en général). Le schéma ci-dessous récapitule le phénomène d'acidification du sol traité.



## VI.2- Evolution du carbone organique

La figure VI-30 présente l'évolution du carbone organique au cours du traitement. Pour la biopile B2, dès la première semaine du traitement une diminution de la concentration du carbone organique est observé en passant de 16,2g/Kg de sol à 11,3 g/Kg de sol en surface et à 13,3 g/Kg de sol en profondeur. En revanche, la concentration en carbone organique dans le témoin reste stable (13,03 g/Kg de sol) pour les 12 premiers jours puis cette concentration baisse légèrement à une valeur de 12,2 g/Kg de sol

Au cours de la seconde phase de la biopile B2, on constate que l'allure générale de la variation du carbone organique ne varie pas. Elle reste plus au moins stable. Par contre celle du témoin continue à diminuer mais à une faible vitesse.

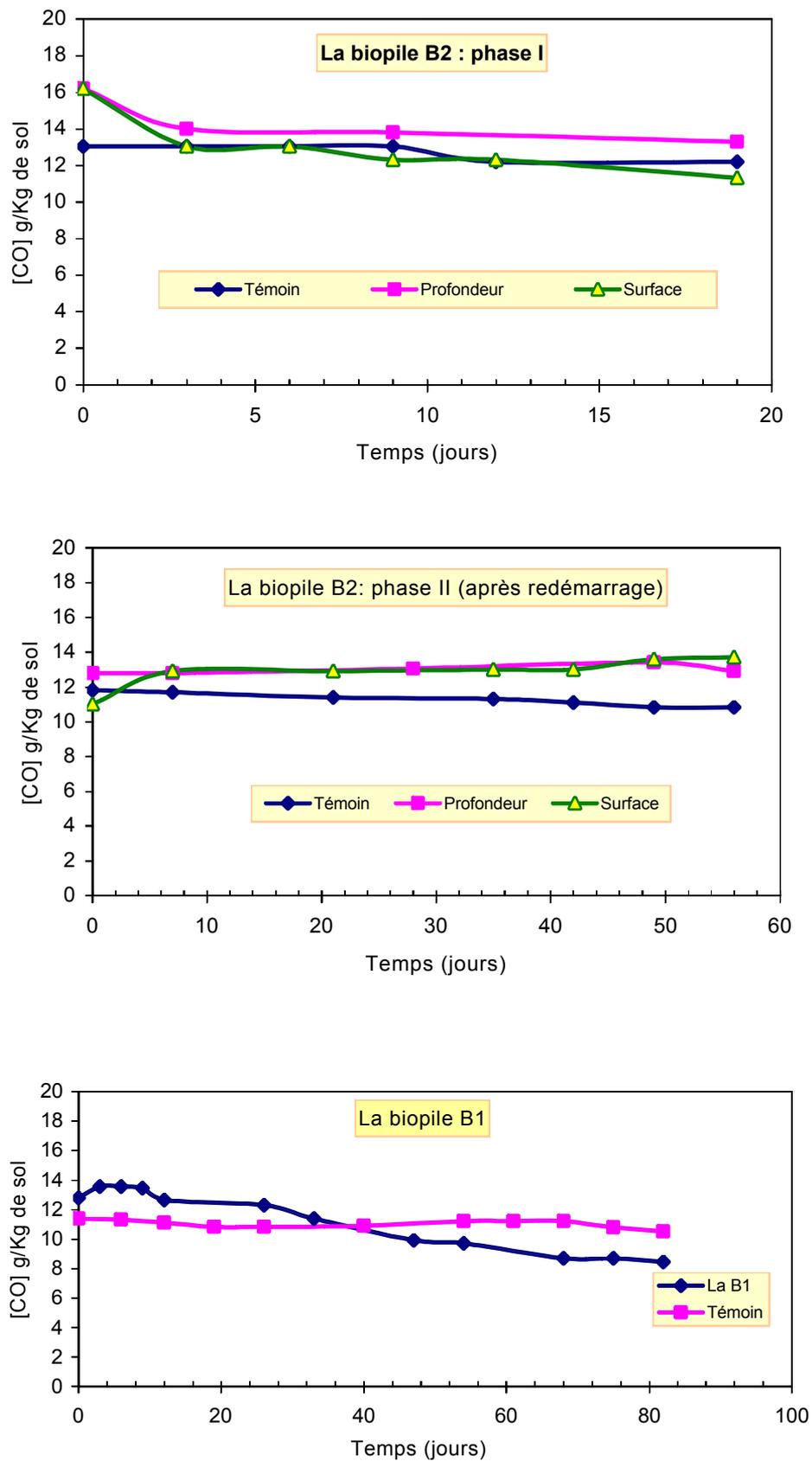


Figure VI-30: Evolution du carbone organique au cours du traitement par les biopiles et les témoins

Notons, que dès la première semaine de la deuxième phase, on observe une légère augmentation du carbone organique à la surface, ceci est dû probablement à l'augmentation du nombre de microorganismes.

Contrairement à la biopile B2, nous avons constaté pour la biopile B1 que la concentration en carbone organique reste stable dans la première semaine du traitement puis commence à baisser jusqu'à atteindre une valeur de 8,44 g/Kg de sol, le témoin reste stable.

Nous tenons à signaler que pour les deux installations, la concentration initiale en carbone organique dans le sol traité est plus élevée que le témoin, ceci est dû à l'enrichissement de ce sol par la pré-culture préparée à partir du même sol.

La diminution du carbone organique peut s'expliquer par le fait de la minéralisation du carbone des hydrocarbures (gasoil) en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. En parallèle, une autre partie de ce carbone va être assimilée et transformée en biomasse microbienne (le carbone de la contamination est utilisé comme source d'énergie et de carbone).

Kastner et Richnow (2001) ont évoqué l'incorporation du carbone des xénobiotiques dans la biomasse microbienne. Au cours du traitement, un équilibre entre l'immobilisation du carbone dans la biomasse microbienne et la minéralisation est atteint d'où la stabilité du carbone organique. Cet équilibre a été aussi observé par Lotter et al (2001) qu'il impute à la formation des métabolites et des substances humiques. La valeur élevée du carbone organique total est liée au taux de minéralisation élevé (Mohn et Stewart, 2000),

### VI.3- Evolution du phosphore au cours du traitement

La figure VI-31 présente la cinétique d'assimilation du phosphore au cours du traitement en biopile.

Les résultats obtenus montrent une nette diminution du phosphore pendant les premiers temps du traitement, suivi par une stabilité de la concentration du phosphore vers la fin du traitement pour les deux biopiles B1 et B2. Nos observations concordent avec celles signalées par Xu et Obbard (2004).

Notons qu'à la fin du traitement, une légère augmentation du phosphore a été enregistrée en profondeur de la biopile B2, ceci pourrait être dû à la lyse de la flore microbienne en profondeur libérant le contenu cellulaire en minéraux.

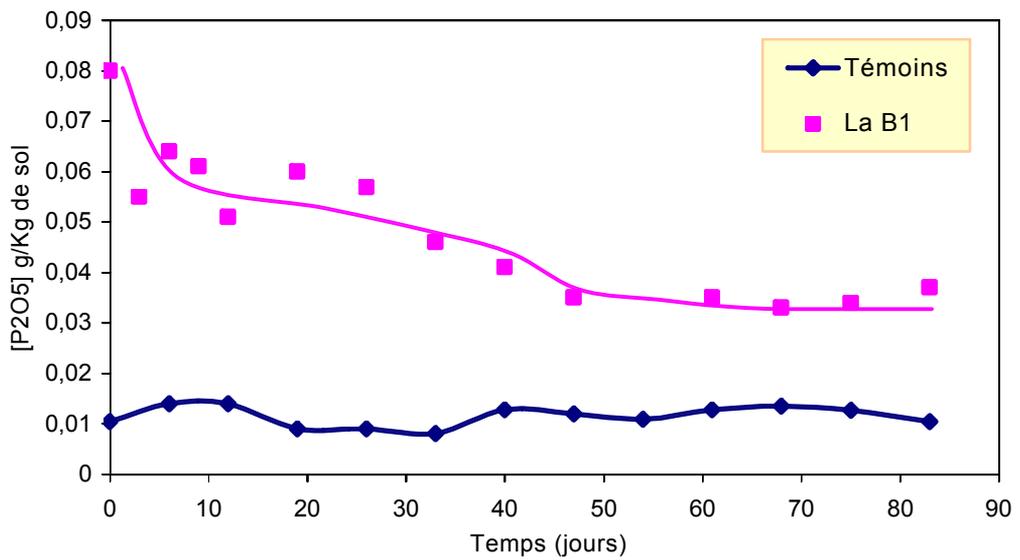
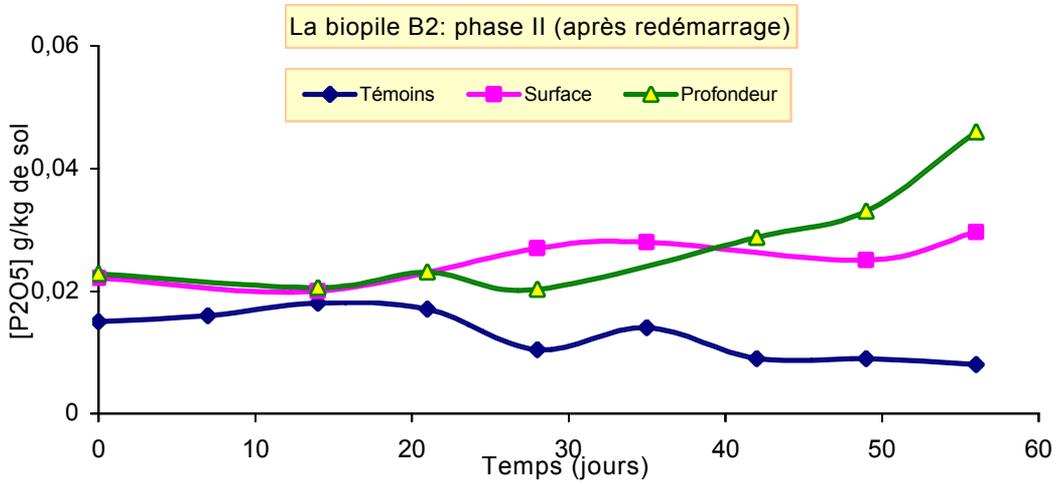
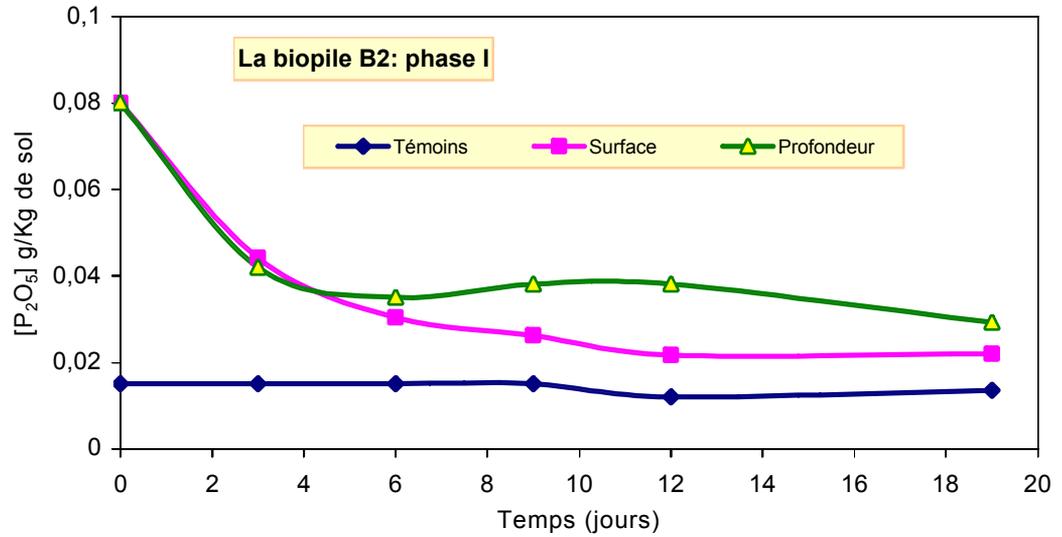


Figure VI-31: Evolution du phosphore assimilable au cours du traitement par les biopiles et les témoins

---

Contrairement au sol enrichi, la concentration du phosphore est restée stable dans le sol non traité (témoin). La vitesse de diminution du phosphore est plus rapide dans la biopile B2 (de 0,08 à 0,03 g/Kg de sol) au cours de la première semaine de traitement contrairement à la biopile B1 où la concentration initiale passe de 0,08 à 0,035 g/Kg de sol pendant les six premières semaines de traitement.

La diminution du phosphore peut être attribuée à l'assimilation du phosphore par la microflore autochtone durant les premiers temps du traitement (où la dégradation du gasoil était notable), d'après Margesin et Schinner (2001) la diminution du phosphore a été provoquée par le métabolisme microbien.

Ceci nous laisse supposer que le phosphore entre dans la composition des constituants de la cellule microbienne et donc joue un rôle crucial dans la croissance microbienne. Selon Meyer et al (1984) et Davet (1996) le phosphore tient une place de choix dans la croissance microbienne, il entre dans la composition des acides nucléiques, l'ATP, les phospholipides et de nombreuses coenzymes. Il est incorporé dans la cellule sous forme de phosphate inorganique.

#### VI.4- Evolution de l'azote totale au cours du traitement

L'évolution de l'azote totale au cours du traitement est représentée par la figure VI-32, d'après les résultats de la première phase, on remarque que l'azote totale diminue surtout en profondeur.

Par contre, nous avons constaté qu'au cours de la seconde phase de la biopile B2 et au niveau de la biopile B1, l'azote totale reste stable durant la période de la dégradation du gasoil, ceci est dû probablement aux activités microbiennes intenses (croissance et décroissance). L'augmentation de la microflore microbienne pendant la phase exponentielle entraîne une consommation accrue des substances azotées. Ces dernières sont utilisées dans la synthèse des protéines et des bases azotées de la cellule microbienne (Meyer et al, 1984).

En parallèle, l'assimilation de l'azote est rééquilibrée par l'azote libéré dans le sol issu de la lyse des cellules microbiennes mortes. Selon Davet (1996), le déclin de la population microbienne entraîne la libération progressive de l'azote qu'elle avait emmagasiné.

#### VI.5- Evolution de l'azote assimilable

Au cours de la biorémediation des sols, il a été effectué un suivi de la variation des différentes formes de l'azote assimilable (azote ammoniacal, azote nitreux et l'azote

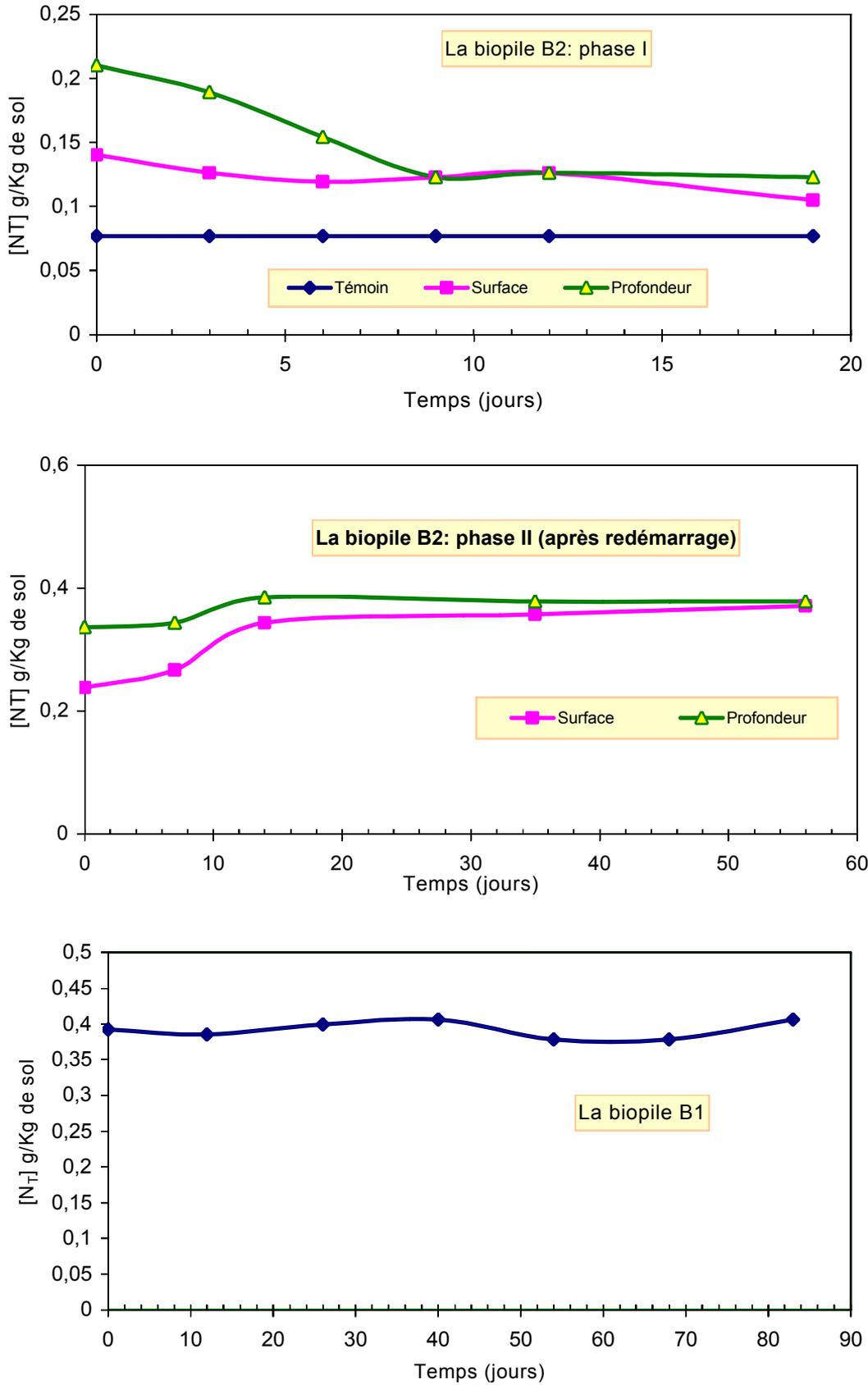


Figure VI-32: Evolution de l'azote totale au cours du traitement par les biopiles et les témoins

---

nitrique). Les résultats obtenus sont représentés sur les figures suivantes : VI-33, VI-34, VI-35. Au début du traitement la concentration en azote ammoniacale pour le sol enrichi est de 0,00875 g/Kg de sol, cette concentration était de 0,00175 g/Kg de sol avant l'addition de l'urée.

Durant les trois premières semaines, une importante régression de la teneur en azote ammoniacale a été constatée avec une vitesse d'assimilation qui diffère entre le sol traité et le témoin (figure VI-33).

La diminution de la teneur en  $\text{NH}_4^+$  durant la première phase dans la biopile B2 (70% de  $\text{NH}_4^+$  éliminée à la surface et 90% de  $\text{NH}_4^+$  éliminée en profondeur) est suivi de l'apparition des nitrates qui augmentent au fur à mesure que la concentration en azote ammoniacal diminue, contrairement au témoin où la concentration en nitrate est nulle.

Par contre, l'augmentation de la concentration en azote nitreux est négligeable par rapport à celle des nitrates. Ceci est dû au fait que la nitratisation étant beaucoup plus rapide que la nitrification et donc l'azote nitreux est une forme transitoire servant de pont à la nitrification.

Cette diminution est attribuée à la transformation de la plus grande partie de l'azote ammoniacal en nitrates par le biais de l'azote nitreux, il s'agit du phénomène de la nitrification. Selon Afee (1989b), ce phénomène est influencé par plusieurs facteurs (l'aération, pH, température, disponibilité du substrat), ces conditions sont réunies dans notre cas. Le phénomène de la nitrification est enregistré durant les trois premières semaines de traitement des sols pollués, ce qui a été constaté par Deni et Penninckx (1999) ; Kiene et al (2001). D'après Khalil (2003) et Feray (2000) et Cole (1994), le phénomène de nitrification se déroule en deux étapes : la nitrification, transformation d'ion ammonium  $\text{NH}_4^+$  en nitrite  $\text{NO}_2^-$  due aux bactéries (Nitrosomonas, Nitrosococcus, etc...) et la nitrification, transformation de l'ion nitrite  $\text{NO}_2^-$  en nitrate  $\text{NO}_3^-$  due aux bactéries (Nitrobacter, etc...). La nitrification est un phénomène autotrophe, mais elle peut être dans certains cas hétérotrophe. Ce dernier processus semble négligeable par rapport à la nitrification autotrophe. Selon Martinelli (1999), le schéma de la nitrification est le suivant :

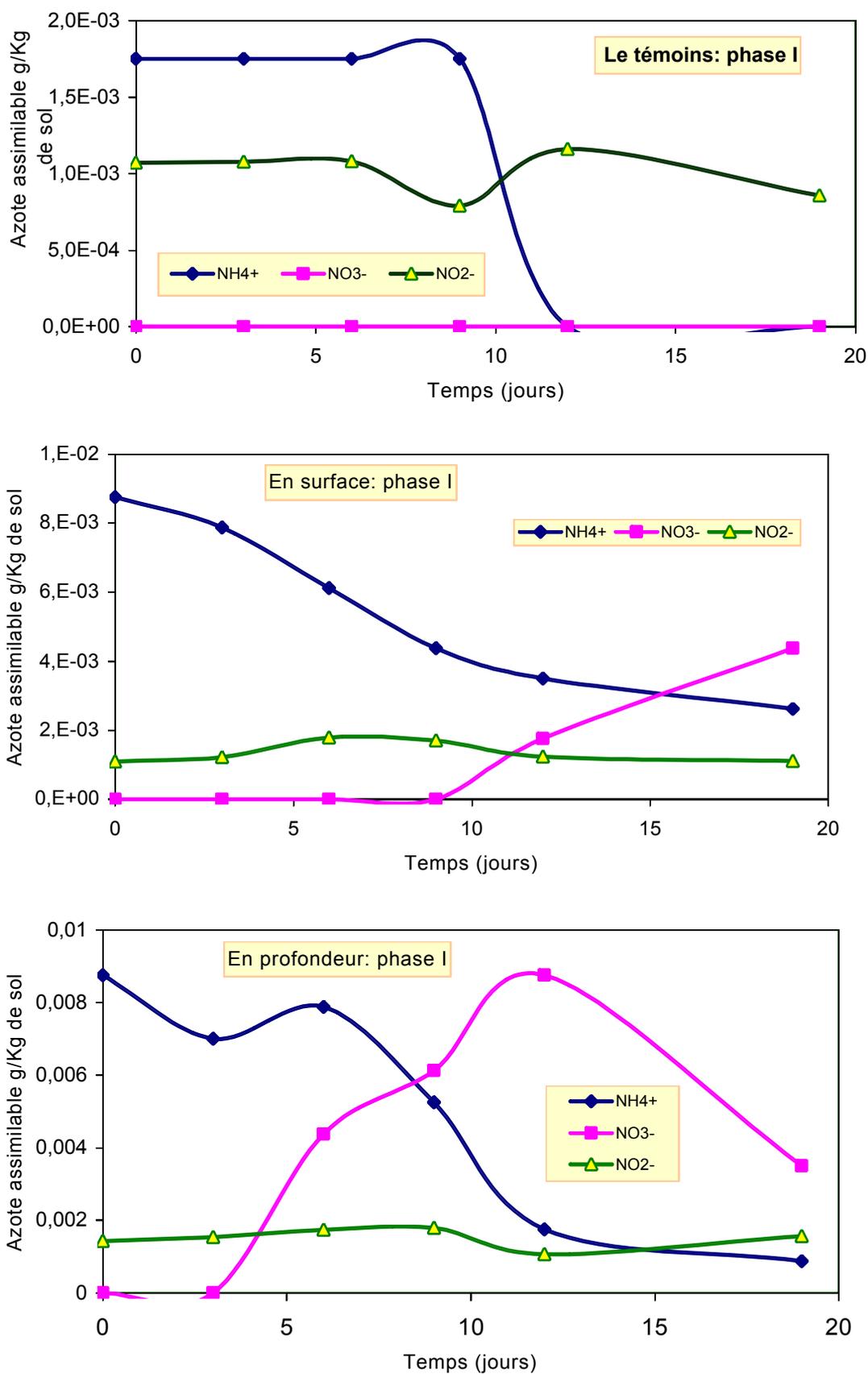


Figure VI-33: Evolution de l'azote assimilable au cours du traitement par la biopile B2 (phase I) et le témoin

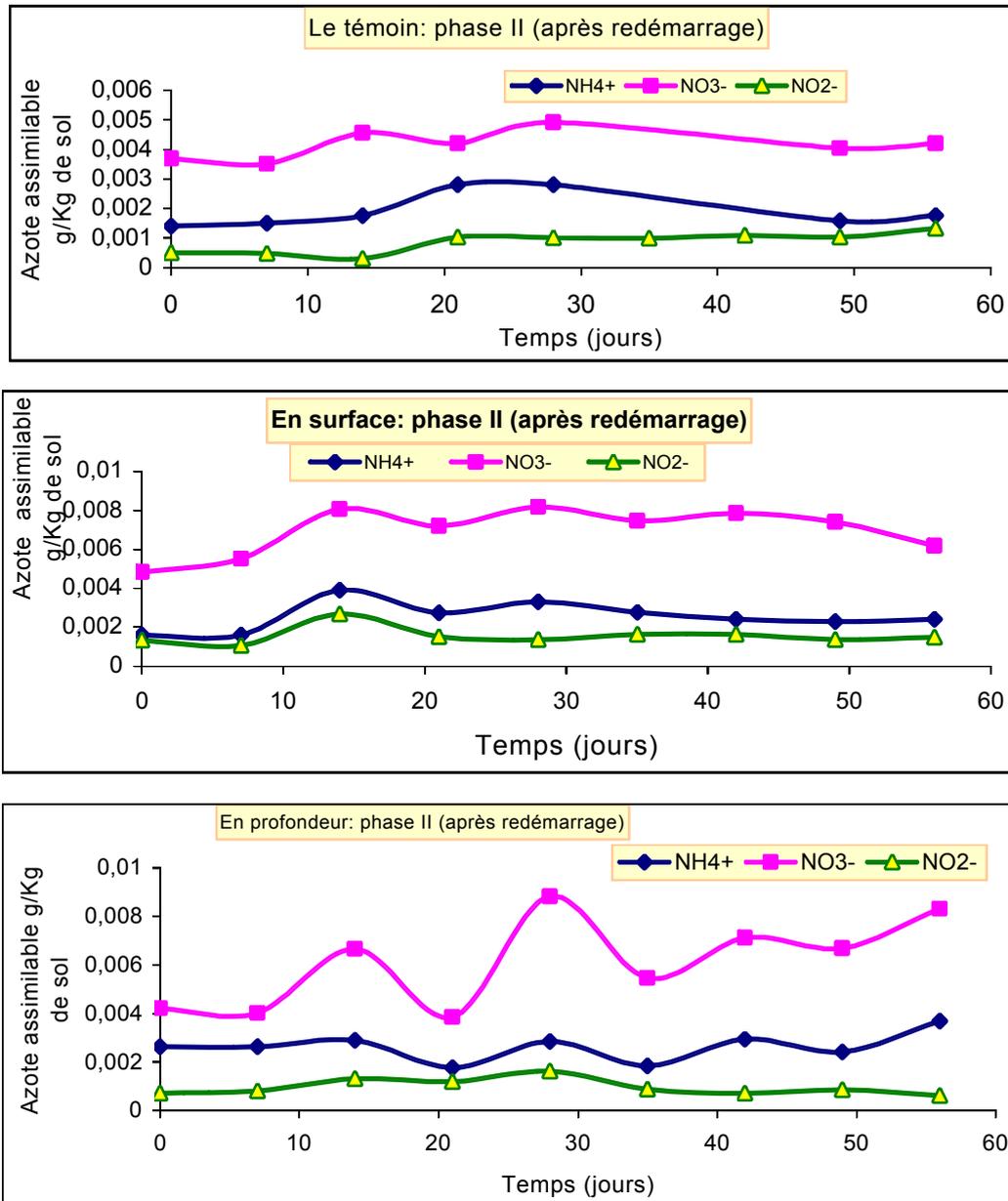


Figure VI-34: Evolution de l'azote assimilable au cours du traitement par la biopile B2 (phase II) et le témoin

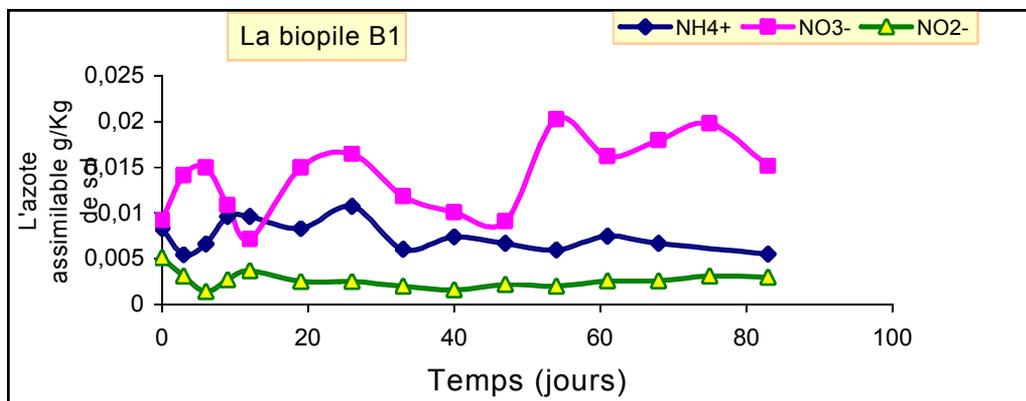
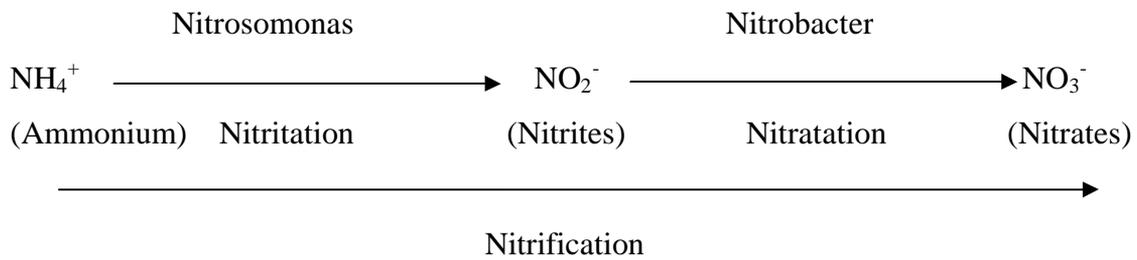


Figure VI-35: Evolution de l'azote assimilable au cours du traitement par la biopile B1

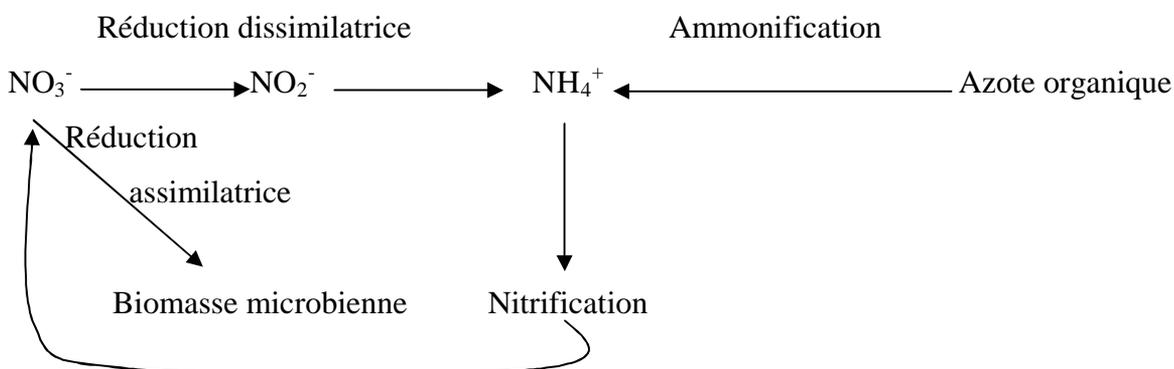


Une régression des nitrates a été notée en profondeur de la biopile B2 à partir du 12<sup>ème</sup> jour pendant la phase exponentielle et d'autre part un déficit en ion ammonium a été constaté, ceci nous amène à supposer que les microorganismes ont consommé les nitrates par biais de la réduction assimilatrice.

Au cours de la deuxième phase (après redémarrage de la bio pile B2), les résultats (voir figure VI-34) révèlent une stabilité de la concentration des différentes formes de l'azote assimilable. Comparée à la première phase, nous avons une augmentation des ions nitrates et des ammoniums au niveau du témoin et en profondeur. Cette stabilité est due probablement à un équilibre :

- Soit entre l'ammonification (synthèse de l'ammonium  $\text{NH}_4^+$  à partir de l'azote organique libéré au cours de la phase du déclin) et la nitrification ; les ions nitrates peuvent être dans ce cas incorporé dans la biomasse microbienne par la réduction assimilatrice. D'après Kiene et al (2001), La minéralisation des composés organiques contenant de l'azote a comme conséquence la production de  $\text{NH}_4^+$ , qui va servir de substrat à la nitrification.
- Soit entre la réduction dissimilatrice (transformation des  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NH}_4^+$ ) et la nitrification ;
- Ou bien les trois activités biologiques ensemble.

Une faible concentration en nitrites est toujours notée puisque ils sont toujours en phase de transition. Le schéma suivant récapitule le devenir des différentes formes d'azote minéral au cours de cette deuxième phase.



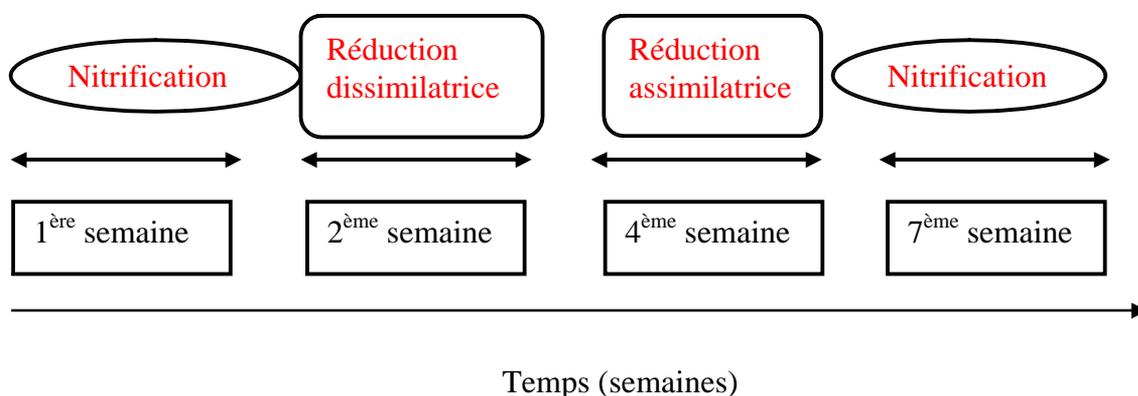
Concernant la biopile B1 voir figure VI-35 pour la première semaine, il s'agit de la nitrification ; diminution de l'ammonium et des nitrites avec élévation des nitrates. La deuxième semaine c'est la réduction dissimilatrice, diminution des nitrates et augmentation des ammoniums et des nitrites. A partir du 26<sup>ème</sup> jour, une diminution des ions ammoniums et nitrates est remarquée au cours de la deuxième phase exponentielle, celle-ci est dû à l'incorporation des nitrates et des ammoniums dans le matériel microbien par la réorganisation ( $\text{NH}_4^+$ ) et la réduction assimilatrice ( $\text{NO}_3^-$ ).

Comme il a été mentionné auparavant une deuxième nitrification a été observée à partir du 47<sup>ème</sup> jour, celle-ci se traduit par une augmentation très importante de la teneur en nitrate (0,02g/Kg de sol).

Selon Davet (1996), il existe quatre devenir pour les nitrates dans le sol :

- La dénitrification
- La réduction assimilatrice
- La réduction dissimilatrice
- Le lessivage

Le schéma suivant résume l'évolution de l'azote minérale dans la biopile B1.



## Conclusion et perspectives

L'objectif fixé dans notre travail est de contribuer à la bioréhabilitation d'un sol pollué par du gasoil à l'aide d'un procédé biologique « Biopile ».

Afin de confirmer le choix de ce procédé comme méthode de biorestauration le mieux adaptée à notre sol. Une étude préliminaire concernant la caractérisation physico-chimique, microbiologique et granulométrique du sol pollué a été réalisée, les résultats obtenus se sont révélés favorable à l'application du procédé « Biopile ».

Nous avons réalisé deux essais de traitement en biopile (l'un à l'échelle laboratoire et l'autre à l'échelle semi-pilote) et un essai sur l'atténuation naturelle, pour pouvoir comparer l'efficacité du procédé.

Les principaux résultats obtenus ont permis de montrer que:

- L'aération est un facteur critique dans la biodégradation des hydrocarbures ;
- L'élimination des TPH se fait en grande partie au cours des vingt premiers jours;
- Les fractions simples (alcanes et les aromatiques) ont été dégradées en premier lieu suivies des fractions complexes
- La microflore responsable de la biodégradation est à prédominance de la population bactérienne ;
- Une synergie a été enregistrée entre les levures et les bactéries pour la biodégradation du gasoil, il s'agit du phénomène de cométabolisme ;
- Pour notre étude, les champignons ne semblent pas jouer un rôle dans la biodégradation du gasoil ;
- Le rendement d'élimination du gasoil dans la biopile à l'échelle semi-pilote est de 85% ;
- Le rendement d'élimination du gasoil par l'atténuation naturelle est d'environ 59,2% ;
- Contribution de la nitrification à la réduction des ions ammonium au cours du traitement.

A ce stade de l'étude, les résultats mettent en évidence la capacité des microorganismes autochtones de dégrader le gasoil. Ils ont fait apparaître que le procédé en « Biopile » est efficace et applicable à nos sols algériens. Il permet d'induire une augmentation de l'activité microbienne, ce qui se traduit par une importante décontamination.

En perspective, il s'agit de compléter par une étude plus approfondie, à savoir :

- L'optimisation des paramètres de traitement (ajout de surfactant, abaissement de pH, ajout des microorganismes spécialisés, enrichissement par des engrais) ;
- Isolement et identification des espèces microbiennes responsables de la biodégradation du gasoil dans cette étude ;
- Etude qualitative de la dégradation du gasoil afin de mieux comprendre le mécanisme microbien impliqué dans notre étude.

- **Abed R. M. M., Safi N. M. D., Köster J., de Beer D., El-Nahhal Y., Rullkötter J., & Garcia-Pichel F.**, “Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, N°4, Apr 2002, p. 1674 – 1683.
- **AFEE** (Association française pour l'étude des eaux), “ Le rôle épurateur du sol ” Tome 1, Le sol, l'eau et les polluants, Lavoisier TEC & DOC, 1989a, p. 146.
- **AFEE** (Association française pour l'étude des eaux), “ Le rôle épurateur du sol ” Tome 2, Le sol, l'eau et les polluants, Lavoisier TEC & DOC, 1989b, p. 101.
- **AFNOR** (Association Française de Normalisation), “ Recueil des normes Françaises sur les méthodes d'analyse de l'eau ”, 1<sup>ère</sup> édition, Lavoisier TEC & DOC, 1979, p. 342.
- **AFNOR** (Association Française de Normalisation), “ Recueil des normes Françaises sur la qualité des sols, méthodes d'analyse”, 1<sup>ère</sup> édition, Lavoisier TEC & DOC, 1987, p. 131.
- **AFNOR norme T 90- 013**, “ Essais des eaux : Dosage des nitrites ”, AFNOR, Août 1975, p. 133- 134.
- **AFNOR norme T 90- 114**, “ Essais des eaux : Dosage des hydrocarbures totaux (Méthodes par spectrophotométrie Infra- Rouge) ”, AFNOR, Oct 1979, p. 483- 442.
- **AFNOR norme X 31- 100**, “ Qualité des sols : Méthode de prélèvement d'échantillons de terre” , AFNOR, Juil 1985, p. 18- 26.
- **AFNOR norme X 31- 101**, “ Qualité des sols : Préparation de l'échantillon pour essai (terre fine)” , AFNOR, Août 1983, p. 27- 30.
- **AFNOR norme X 31- 102**, “ Qualité des sols : Détermination de l'humidité résiduelle d'échantillons de sols préparés pour analyse” , AFNOR, Juin1981, p. 31- 32.
- **AFNOR norme X 31- 103**, “ Qualité des sols : Mesure du pH (H<sub>2</sub>O)- méthode électrométrique ” , AFNOR, Juin1981, p. 33- 34.
- **AFNOR norme X 31- 105**, “ Qualité des sols : Calcaire total (Evaluation des carbonates)” , AFNOR, Juil 1982, p. 37- 40.
- **AFNOR norme X 31- 107**, “ Qualité des sols : Analyse granulométrique par sédimentation (Méthode de la pipette)” , AFNOR, Juil 1983, p. 45- 59.
- **AFNOR norme X 31- 108**, “ Qualité des sols : Détermination des bases échangeable par l'acétate d'ammonium (Méthode par agitation)” , AFNOR, Mai 1982, p. 60- 66.
- **AFNOR norme X 31- 109**, “ Qualité des sols : Détermination du carbone organique par oxydation sulfochromique ” , AFNOR, Nov 1985, p. 67- 71.
- **AFNOR norme X 31- 111**, “ Qualité des sols : Détermination de l'azote total -Méthode par distillation après minéralisation (Kjeldahl)” , AFNOR, Juil 1983, p. 72- 75.
- **AFNOR norme X 31- 113**, “ Qualité des sols : Détermination de la conductivité électrique d'un extrait aqueux de terre” , AFNOR, Sept 1986, p. 76- 85.
- **AFNOR norme X 31- 116**, “ Qualité des sols : Détermination du phosphore” , AFNOR, Nov 1984, p. 86- 99.
- **AFNOR norme X 31- 130**, “ Qualité des sols : Détermination de la capacité d'échange cationique et des cations échangeables” , AFNOR, Nov 1985, p. 111- 122.

- **Ait Ali G.**, “ **Mesure de réglementation pour la protection de l’environnement dans les activités d’exploration et d’exploitation des hydrocarbures** ”, Document interne du Ministère de l’énergie et des mines, 1998.
- **Alexander R. R., Tang J., & Alexander M.**, “Ecological Risk Assessment: Genotoxicity is Unrelated to Total Concentration of Priority Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Undergoing Biological Treatment”, J. ENVIRON. QUAL., Vol. 31, 2002, p. 150–154
- **Annweiler E., Richnow H. H., Antranikian G., Hebenbrock S., Garms C., Franke S., Francke W., and Michaelis W.**, “Naphthalene Degradation and Incorporation of Naphthalene – Derived Carbon into Biomass by the Thermophile *Bacillus Thermoleovorans*”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, N°2, Feb 2000, p. 518 – 523.
- **Atlas R. M. et Bartha R.**, “Microbial ecology- Fundamentals and applications”, 3<sup>ème</sup> éd. Benjamin Cummings, Redwood City, CA, 1993.
- **Aubert G.**, “ Méthodes d’analyses des sols”, CNDP, 1978, p. 191.
- **Badarou R. et Seddor C.**, “Raffinage du pétrole et spécificités techniques de l’essence, evolution des consommations actuelles d’essence, passage aux essences sans plomb et répercussion pour les raffineries”, 2004, The Clean Air Initiative (CAI), ONG, [http://www.cleanairnet.org/ssa\\_fr](http://www.cleanairnet.org/ssa_fr)
- **Baldwin B. R., Nakatsu C. H., and Nies L.**, "Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 6, June 2003, p. 3350 - 3358
- **Ballerini D. et Vandecasteele J. P.**, “ La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques ”, In : Biotechnologie, coordinateur R. Scriban, 5<sup>ème</sup> édition, Edition Tech et Doc, 1999, p. 835- 865.
- **Ballerini D.**, “ Traitements biologiques des sols ”, Technique de l’ingénieur, traité Environnement, G2 620, 1999, p. 1- 6.
- **Barkay T., Navon-Venezia S., E. Z. Ron, and E. Rosenberg**, “Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan”, Appl. Environ. Microbiol. 65, 1999, p. 2697–2702.
- **Bastiaens L., Springael D., Wattiau P., harms H., Wachter R. D., Verachtert H., and Diels L.**, “Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)- Degrading Bacteria Using PAH- Sorbing Carriers”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, N°. 5, May 2000, p. 1834 – 1843.
- **Battelle et NFESC**, “Biopile operations and maintenance manual”, Technical Memorandum TM-2190-ENV, 1996, p. 65.
- **Bodour A., Drees K. P., & Maier R. M.**, “Distribution of Biosurfactant – Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, N°. 6, June 2003, p. 3280 – 3287.
- **Bogan B. W. et Sullivan W. R.**, “Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil”, Chemosphere, 52, 2003, p. 1717 – 1726.

- **Boldrin B., Tiehm A., and Fritzsche C.**, “Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene, and Pyrene by a Mycobacterium sp.”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, N°6, June 1993, p. 1927 – 1930.
- **Boonchan S., Britz M. L., and Stanley G. A.**, “Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No.3, Mar. 2000, p. 1007 – 1019.
- **Bouchez M.**, “ La biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques : métabolisme du substrats non conventionnels”, thèse de doctorat de l’école nationale supérieure des industries agro-alimentaires, 1995, p. 245.
- **Boughedaoui L., Bennadji H., Bennadji A. et Radju G.**, “ Analyses des sols”, travaux pratiques d’agropédologie, Institut National Agronomique, département de science du sol, 1986.
- **Buckman H. O. et Brady N. C.**, “ les sols nature et propriétés précis d’édaphologie ”, Intercontinental éditions, INC, New York, 1965, p. 498.
- **Canet R., Birnstingl J. G., Malcolm D. G., Lopez-Real J. M., Beck A. J.**, “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil”, Bioresource Technology, 76, 2001, p. 113 – 117.
- **Castany G.**, “ Principes et méthode de l’hydrologie ”, In : le rôle épurateur du sol Tome 1, Le sol, l’eau et les polluants, AFEE (Association française pour l’étude des eaux), 1989a, p. 19.
- **Chablain P. A., Zgoda A. L., Sarde C.-O, and Truffaut N.**, “Genetic and Molecular Organization of the Alkylbenzene Catabolism Operon in the Psychrotrophic Strain Pseudomonas putida 01G3”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67. No. 1, Jan. 2001, p. 453 – 458.
- **Chang B. V., Shiung L. C., Yuan S. Y.**, “Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil”, Chemosphere, 48, 2001, p. 717 – 724.
- **Chatila S. G.**, “ Evaluation des pétroles bruts”, In pétroles bruts “ 1” produits pétroliers schéma de fabrication sous la coordination de Jean Pierre Wauquier, édition technip, 1994, p. 323- 350.
- **Chaussod R.**, “ La qualité biologique des sols : Evaluation et implications’”, Etude et Gestion des Sols, 3, 4, numéro spécial, 1996, p. 261 – 278.
- **Chayabutra C. et JU L. K.**, “Degradation of n- Hexadecane and Its Métabolites by Pseudomonas aeruginosa under microaerobic and Anaerobic Dentrifying conditions ’’, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 2, Fév. 2000, p. 493 –498.
- **Cheung P. Y. et Kinkle B. K.**, “Mycobacterium Diversity and Pyrene Mineralization in Petroleum-Contaminated Soils”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, N°5, May 2001, p. 2222 – 2229.

- **Chung W. K. and King G. M.**, “Isolation, Characterization, and Polyaromatic Hydrocarbon Degradation Potential of Aerobic Bacteria From Marine Macrofaunal Burrow Sediments and Description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus Spirillensus* sp. nov.”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, N°12, Dec 2001, p. 5585 – 5592.
- **Churchill S. A., Harper J. P., Churchill A. F.**, “Isolation and Characterization of a *Mycobacterium* Species Capable of Degrading Three- and Four-Ring Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, No. 2, Feb. 1999, p. 549–552.
- **Cole J. A.**, “Biodegradation of inorganic nitrogen compounds”, In: Biochemistry of microbial dégradation, coordinateur C. Ratledge, Ed Kluwer Academic Publishers, 1994, p. 487-512.
- **Colin F.**, “ Pollution localisée des sols et sous sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés”, à l’initiative du comité de l’environnement de l’académie des sciences”, rapport N° 44, édition TEC et DOC, 2000, p. 417.
- **Comeau Y.**, “ Biorestauration des sols contaminés” cours professé à l’ Ecole Polytechnique de Montréal, Etudes supérieurs en génie de l’environnement, 1999.
- **Cooney J. J., Siporin C. and. Smucker R. A.**, “Physiological and cytological responses to hydrocarbons by the hydrocarbon- using fungus *Cladosporium resinae*”, Bot. Mar., 23, 1980, p. 227- 232.
- **Costes J. M. et Druelle V.**, “les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l’environnement”, la réhabilitation des anciennes sites industriel, Revue de l’institut français du pétrole, Vol. 52, No. 4, 1997, p. 425- 440.
- **Coulomb C.**, “Etude de la circulation de l’eau dans un sol argileux drainé”, Thèse, Université Paris-Sud, n° 2154, 1992, p. 245.
- **Coulon F. et Delille D.**, “Effects of Biostimulation on Growth of Indigenous Bacteria in Sub-Antarctic Soil Contaminated with Oil Hydrocarbons”, Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP, Vol. 58, No. 4, 2003, p. 469-479.
- **Davet P.**, “Vie microbienne du sol et production végétale”, INRA édition, 1996, p. 383.
- **Deni J. et Penninckx M. J.**, “Nitrification and Autotrophic Nitrifying Bacteria in a Hydrocarbon-Polluted Soil” , Applied and Environmental Microbiology, 1999, Vol. 65, No. 9, p. 4008–4013.
- **DETALC** (Programme de développement et de démonstration de techniques d’assainissement de lieux contaminés), “ Biotraitement de sols contaminés par des huiles de transformateurs (Boucherville) et du Diesel (Jonquière) ”, résumé du projet, Québec, Août 1994.
- **Doty S. L., Shang T. Q., Wilson A. M., Tangen J., Westergreen A. D., Newman L. Strand A., S. E., and Gordon M. P.**, “Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian cytochrome P450 2E1”, Applied Biological Science, Vol. 97, N°12, June 2000, p. 6287 – 6291.
- **Eckford R., Cook F. D., Saul D., Aislabie J., and Foght J.**, “Free-Living Heterotrophic Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Fuel-Contaminated Antarctic Soils”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 10, 2002, p. 5181–5185.

- **Enspm**, “ Méthodes et techniques analytiques appliquées aux hydrocarbures et à leurs dérivées : Détecteurs spécifiques pour le dosage des composés soufrés et azotés dans les coupes pétrolières (par chromatographie en phase gazeuse)”, NAFTEC, 1993, p. 25.
- **Eriksson M., Ka J. O., and Mohn W. W.**, “Effects of Low Temperature and Freez-Thaw Cycles on Hydrocarbon Biodegradation in Arctic Tundra Soil”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, N°11, Nov 2001, p. 5107 – 5112.
- **Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., and Mohn W. W.**, “Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, N°1, Jan 2003, p. 275 – 284.
- **Fan S. et Scow K. M.**, “Biodegradation of Trichloroethylene and Toluene by Indigenous Microbial Populations in Soil”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, No. 6, June 1993, p. 1911-1918.
- **Favennec J. P.**, “ Le raffinage du pétrole : exploitation et gestion de la raffinerie”, Tome 5, édition Technip, Paris, 1998, p. 575.
- **Féray C.**, Nitrification en sédiments d’eau douce : incidence de rejets de station d’épuration sur la dynamique de communautés nitrifiantes, thèse de Doctorats, Université Claude-Bernard-Lyon I, 2000, p. 103.
- **Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat J., Garcia-Valdés E., Rossello-Mora R., and Bosch R.**, “Coexistence of Two Distinct Copies of Naphthalene Degradation Genes in Pseudomonas Strains Isolated from the Western Mediterranean Region”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, N°2, Feb 2002, p. 957 – 962.
- **Finnerty W. R. et Singer M. E.**, “ **Membranes of hydrocarbon- utilizing microorganisms**”, **In: Organization of Prokaryotic Cell Membranes**, B. K. Gosh (ed), Volume III, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985, p. 1- 44.
- **Foght J. M., Gutnick D. L, and Westlake D. W. S.**, “Effect of Emulsan on Biodegradation of Crude Oil by Pure and Mixed Bacterial Cultures”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 55, N°1, Jan 1989, p. 36 – 12.
- **G.I.E (Groupe conseil G.I.E. Inc)**, “ Bioremédiation in-situ à l’aide de puits horizontaux ”, L’eau, l’industrie, les nuisances, N° 230, 2000.
- **Garon D., Krivobok S., Wouessidjewe D., Seigle-Murandi F.**, “Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene” Chemosphere, Vol. 47, No. 3, Avr 2002, p. 303- 9.
- **Gatelier G.**, “ Protection de l’environnement dans le milieu industriel”, Technique de l’ingénieur, A8652-7, 1992.
- **Geerdink M. J., Kleijntjens R. H., Van Loosdrecht M. C. M., et Luyben K. C. A. M.**, “ Microbial decontamination of polluted soil in a slurry process”, Journal of environmental engineering, nov 1996, p. 975- 982.

- **Geiselbrecht A. D., Hedlund B. P., Tichis M. A., and Staley J. T.**, “ Isolation of Marine Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)- Degrading Cycloclasticus strains from the Gulf of Mexico and Comparison of their PAH Degradation Ability with That of Puget Sound Cycloclasticus Strains”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, N°12, Dec 1998, p. 4703 – 4710.
- **Goswami P. et Singh H. D.**, “Different modes of hydrocarbon uptake by two Pseudomonas species”. Biotechnol. Bioeng, 37, 1991, p. 1- 11.
- **Haeseler F., Blanchet D., Le Thiez P.**, “ Réhabilitation des sites contaminés par hydrocarbures-de l'évaluation des risques à la dépollution : une approche intégrée”, Bull.Soc.Fr.Microbiol, Vol 16, N°3, 2001, p. 197-203.
- **Hanson J. R., Macalady J. L., Harris D., and. Scow K. M.**, “Linking Toluene Degradation with Specific Microbial Population in Soil”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, N°12, Dec 1999, p. 5403 – 5408.
- **Heitkamp M. A., Freeman J. P., and Cerniglia C. E.**, “Naphthalene Biodegradation in Environmental Microcosms: Estimates of Degradation Rates and Characterization of Metabolites”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 53, N°1, Jan 1987, p. 129 – 136.
- **Holiger C., Zehnder A. J. B.**, “Anaerobic biodegradation of hydrocarbons”, Current opinion in Biotechnology, 7, 1996, p. 326- 330.
- **Hommel R. K.**, “ Formation and function of biosurfactant for dégradation of water-insoluble substrats”, In: Biochemistry of microbial dégradation, coordinateur C. Ratledge, Ed Kluwer Academic Publishers, 1994, p. 63- 87.
- **Iwabuchi N., Sunairi M., Anzai H., Nakajima M., and S. Harayama**, “relationships between colony morphotypes and oil tolerance in Rhodococcus rhodochrous”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, N°11, Nov 2000, p. 5037 – 5077.
- **Iwabuchi N., Sunairi M., Urai M., Itoh C., H. Anzai, M. Nakajima, and S. Harayama**, “Extracellular Polysaccharides of Rhodococcus rhodochrous S-2 Stimulate of Degradation of Aromatic Components in Crude Oil by Indigenous Marine Bacteria”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, N°5, May 2002, p. 2337 – 2343.
- **J.O.R.A.**, “ Réglementation des rejets d'effluents liquides industriels ”, (Journal Officiel de RADP décrets exécutif N° 93- 160, 1993.
- **Jeannot R., B. Lemièrre, S. Chiron**, avec la collaboration de F. Augustin, D. Darmendrail, “Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués”, document du BRGM 298, éditions BRGM, 2001, p. 101.
- **Jegaden D.**, “ Risques toxicologiques à bord des navires”, 2004, Société française de médecine maritime ( [http:// www. Mersante. Com](http://www.Mersante.Com)), 2005
- **Johnsen R., Wick L. Y., Harms H.**, “Principles of microbial PAH-degradation in soil”, Environmental Pollution, 133, 2005, p. 71 – 84.

- **Kanaly R. A. et Harayama S.**, “Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria” MINIREVIEW, Journal of Bacteriology, Vol. 182, No. 8, Apr. 2000, p. 2059-2067.
- **Kanaly R. A., Bartha R., Watanabe K., Harayama and S.**, “Rapid Mineralization of Benzo[a]pyrene by a Microbial Consortium Growing on Diesel Fuel”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 10, Oct. 2000. p. 4205 – 4211.
- **Kanaly R. A., Harayama S., and Watanabe K.**, ‘Rhodanobacter sp. Strain BPC1 in a Benzo [a] pyrene-Mineralizing Bacterial Consortium’, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 12, Dec. 2002, p. 5826–5833. Vol.
- **Kappeli O. et Finnerty W. R.**, “Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane- grown *Candida tropicalis*”, J. Bacteriol, 140, 1979, p. 707- 712.
- **Kästner M. et Richnow H. H.**, “Formation of residues of organic pollutants within the soil matrix-mechanisms and stability”, In: Treatment of contaminated soil fundamentals analysis applications, R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmano, G. Matz, Springer ed, 2001, p. 219-251.
- **Kästner M., Breuer-Jammali M., and Mahro B.**, “Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64. No. 1, Jan. 1998. p. 359 - 362.
- **Kästner M., Streibich S., Beyrer M., Richnow H. H., and Fritsche W.**, “ Formation of Bound Residues during Microbial Degradation of [14 C] Anthracene in Soil”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, No. 5, May 1999, p. 1834–1842.
- **Kazunga C., and Aitken M. D.**, “Products from the Incomplete Metabolism of Pyrene by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 5, May 2000, p. 1917-1922,
- **Khalil K.**, Emissions de N<sub>2</sub>O par nitrification et dénitrification à l’échelle de la motte de sol: effet de la structure du sol, de l’aération et des activités microbiennes, thèse de Doctorat de l’université Paris 6, 2003, p. 226.
- **Khan A., Wang R. F., Cao W. W., Doerge D. R, Wennerstrom D., and Cerniglia C. E.**, “Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Genes Encoding a Polycyclic Aromatic Ring Dioxygenase from Mycobacterium sp. Strain PYR-1”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 8, Aug. 2001, p. 3577-3585
- **Kiene, Miehlisch G., Grongroft A.**, “Influence of oil-contaminated on N-mineralisation in soils”, In: Treatment of contaminated soil fundamentals analysis applications, R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmano, G. Matz, Springer ed, 2001, p. 386-398.
- **Kirk P. W. et Gordon A. S.**, “ Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi”, Mycologia, 80, 1988, p. 776- 782.
- **Kock K., Kapelli O., Fiechter A., Keiser J.**, “Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants”, J. Bacteriol, 173, 1991, p. 4212- 4219.
- **Koike K., Ara K., Adachi S., Takigawa H., Mori, H. Inoue S., Kimura Y., and Ito S.**, “ Regiospecific Internal Desaturation of Aliphatic Compounds by

a Mutant Rhodococcus Strain”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, No. 12, Dec 1999, p. 5636- 5638.

- **Labrecque M. H.**, “Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène”, Maîtrise en microbiologie agricole, 2003 Université de Laval
- **Lalumière J. S. et Richard A.**, “ Le pétrole : l’or noir du XX<sup>ème</sup> siècle”, remis à Kairos Université du Québec à Montréal – UQAM, Montréal, 15 mai 2002, p. 63.
- **Langworthy D. E., Stapleton R. D., Saylor G. S., and Findlay R. H.**, “Genotypic and Phenotypic Responses of a Riverine Microbial Community to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contamination”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, No. 9, Sept 1998, p. 3422–3428.
- **Laurent D.**, “ **Le pétrole** ”, 2004, Université de Mons Hainaut, Belgique, [http://www.umh.ac.be/~ichim/docs/studs02-03/le\\_petrole.html](http://www.umh.ac.be/~ichim/docs/studs02-03/le_petrole.html).
- **Lecompte P.**, “ Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines”, édition Lavoisier, TEC & DOC, 1995, p. 198.
- **Lemière B., Seguin J.J., Le Guren C., Guyonnet D., Baranger Ph., Darmendrail D., Conil P.**, “Guide sur le comportement des polluants dans le sol et les nappes”, document du BRGM 300, éditions BRGM, 2001, p. 119.
- **Lindely N. D. et Heydeman M. T.**, “Mecanism of dodecane uptake by whole cells of *Cladosporium resinae*”, J. Gen. Microbiol, 132, 1986, 751- 756.
- **Lindely N. D. et Heydeman M. T.**, “The uptake of n-alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon- utilizing fungus *Cladosporium resinae*”, Appl. Microbiol. Biotechnol, 23, 1988, p. 384- 388.
- **Little C. D., Palumbo A. V., Herbes S. E., Lidstrom M. E., Tyndall R. L, and Gilmer P. J.**, “Trichloroethylene Biodegradation by a Methane-Oxidizing Bacterium”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54. No. 4 Apr. 1988, p. 951-956.
- **Lotter S., Heerenklage J., Stegmann R.**, “Carbon balance and modelling of oil degradation in soil bioreactors”, In: Treatment of contaminated soil fundamentals analysis applications, R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmano, G. Matz, Springer ed, 2001, p. 355-363.
- **M. B. Mesarch, C. H. Nakatsu, and L. Nies**, "Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 2, Feb. 2000, p. 678-683.
- **Maeda T., Takahashi Y., Suenaga H., Suyama A., Goto M., and Furukawa K.**, “**Functional Analyses of Bph-Tod Hybrid Dioxygenase, Which Exhibits High Degradation Activity Toward Trichloroethylene**”, The journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 32, August 2001, p. 29833 – 29838.
- **Marchal R., Penet S., Solano-Serena F., Vandecasteele J.P.**, “Gasoline and Diesel Oil”, Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP, Vol. 58, No. 4, 2003, p. 441-448.
- **Margesin R. et Schinner F.**, “ Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 7, July 2001, p. 3127-3133.

- **Margesin R., Labbé D., Schinner F., Greer C. W., and Whyte L. G.**, “Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 6, June 2003, p. 3085-3092.
- **Martellini I.**, “Infiltration des eaux de ruissellement pluvial et transfert de polluants associés dans le sol, urbain vers une approche globale et pluridisciplinaire”, thèse de Doctorat, Institut national des sciences appliquées de Lyon, 1999, p. 207.
- **Mayer A., Deiana J., Leclerc H.**, “Cours de microbiologie générale”, Doin éditeurs, 1984, p. 309.
- **Meckenstock R. U., Safinowski M., Griebler C.**, “Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons”, FEMS Microbiology Ecology, 49, 2004, p. 27-36.
- **Menn F. M., Applegate B. M., and Sayler G. S.**, “NAH Plasmid-Mediated Catabolism of Anthracene and Phenanthrene to Naphthoic Acids”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, No. 6, June 1993, p. 1938-1942.
- **Mohn W. W. et Stewart G. R.**, “Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils”, Soil Biology & Biochemistry, 32, 2000, p. 1161 – 1172.
- **Moody J. D., Freeman J. P., Doerge D. R., and Cerniglia C. E.**, “Degradation of Phenanthrene and Anthracene by Cell Suspensions of Mycobacterium sp. Strain PYR-1”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 4, Apr. 2001, p. 1467 - 1483.
- **Morel R.**, “Les sols cultivés”, Lavoisier, Paris, 1996.
- **Morgan P., Watkinson R. J. & Ratledge C.**, “Biodegradation of components of petroleum”, In: Biochemistry of microbial degradation Ed Kluwer Academic Publishers, 1994, p. 1-31.
- **Namkoong W., Hwang E. Y., Park J. S., and Choi J. Y.**, “Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting”, Environmental Pollution, Vol. 119, No. 1, 2002, p. 23- 31.
- **Narro L., Cerniglia C. E., Van Baalen C., and Gibson D. T.**, “Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. Appl. Environ. Microbiol., 58, 1992, p. 1351- 1359.
- **Narro M. L.**, “Oxidation of aromatic hydrocarbons by marine cyanobacteria”, Ph.D. thesis. University of Texas at Austin, Austin, 1985.
- **Parales R. E., Ditty J. L., and Harwood C. S.**, “Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 9, Sept. 2000, p. 4098 – 4104.
- **Penberthy J. et Weston R. F.**, “Remediation of Diesel and Fuel Oil Hydrocarbons in high clay content soils: A field comparison of amendment performance conducted at the Mare Island Naval Shipyard ”, 2005, <http://www.Environmental-expert.com/consulting/weston/penberthy.pdf>.

- **Potin O., Rafin C., and Veignie E.**, "Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil", International Biodeterioration & Biodegradation, 54, 2004a, p. 45 – 52.
- **Potin O., Veignie E., and Rafin C.**, "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil", FEMS Microbiology Ecology, 51, 2004b, p. 71-78.
- **Prenafeta-Boldú F. X., Vervoort J., Grotenhuis J. T. C., and van Groenestijn J. W.**, "Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain TI", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 6, June 2002, p. 2660 - 2665.
- **Rateldge C.**, "Degradation of aliphatic hydrocarbons", In: Developments in Biodegradation of Hydrocarbons, R. J. Watkinson (ed), Applied Science, London, 1, 1978, p. 1- 46.
- **Rehmann K., Hertkorn N., and Kettrup A. A.**, "Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth", Microbiology, 147, 2001, p. 2783 – 2794.
- **Robert M.**, le sol: interfacé dans l'environnement, ressource pour le développement", édition masson, 1996, p. 244.
- **Rodier J.**, "L'analyse de l'eau, eau naturelle, eau résiduaire, eau de mer", Ed Dunod, Paris, 1996, p. 386- 401.
- **Roussel J. C., Boulet R.**, "Fractionnement et analyse élémentaires des pétroles bruts et des coupes pétrolières ", In pétroles bruts " 1" produits pétroliers schéma de fabrication sous la coordination de Jean Pierre Wauquier, édition technip, 1994, p. 17- 34.
- **Russell S.**, " Devenir et effets des hydrocarbures répandus", Sect 04-fr, Sep 1999, Banque mondiale url : <http://www.worldbank.org/afr/ccproj/environmental/pdfs/f.pdf>.
- **Sack U., Heinze T. M., Deck J., Cerniglia C. E., Cazau M. C., and Fritsche' W.**, "Novel Metabolites in Phenanthrene and Pyrene Transformation by *Aspergillus niger*", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63. No. 7, July 1997, p. 2906-2909.
- **Sakamoto T., Joern J. M., Arisawa A., and Arnold F. H.**, "Laboratory Evolution of Toluene Dioxygenase To Accept 4-Picoline as a Substrate", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 9, Sept. 2001, p. 3882 - 3887
- **Samanta S. K., Singh O. V., and Jain R. K.**, "Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation", TRENDS in Biotechnology, Vol. 20, No. 6, June 2002, p. 243 – 248.
- **Samson R.**, " Biorestoration des sites contaminés: les technologies in-situ et ex-situ ", Cahier technique réalisé pour le CQVB (centre québécois de valorisation de la biomasse), 1994.

- **Sanseverino J., Applegate B. M., Henry King J. M., and Sayler G. S.**, “Plasmid-Mediated Mineralization of Naphthalene, Phenanthrene, and Anthracene”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, No. 6, June 1993, p. 1931-1937.
- **Schneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W., and. Warshawsky D.**, “Degradation of Pyrene, Benz[a]anthracene, and Benzo[a]pyrene by Mycobacterium sp. Strain RJGII-135, Isolated from a Former Coal Gasification Site”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, No. 1, Jan 1996, p. 13 - 19.
- **Scott C. C. L. et Finnerty W. R.**, “A comparative analysis of the ultrastructure of hydrocarbon- oxidizing microorganisms”, J. Gen. Microbiol., 94, 1976a, p. 342- 350.
- **Scott C. C. L. et Finnerty W. R.**, “Characterisation of intracytoplasmic hydrocarbon inclusions from the hydrocarbon- oxidizing Acinetobacter sp. HO1-N”, J. Bacteriol., 127, 1976b, p. 481- 489.
- **Singer M. E. et Finnerty W. R.**, “Microbial metabolism of straight- chain and branched alkanes”, In: Petroleum Microbiology, R. M. Atlas (ed), Macmillan, New York, 1984a, p. 1- 59.
- **Solano-Serena F., Marchal R., et Vandecasteele J. P.**, “Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement : de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants”, Oil & Gas Science and Technology- Rev. IFP, Vol. 56, No. 5, 2001, p. 479-498.
- **Soltani M.**, “Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone”, thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique, 2004, p. 284.
- **Sonatrach**, “Rapport annuel 2003”, 2003, Rapport interne Sonatrach
- **Stapleton R. D., savage D. C., Sayler G. S., and Stacey G.**, “Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons in an Extremely Acidic Environment”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, No. 11, Nov 1998, p. 4180 - 4184.
- **Suenaga H., Mitsuoka M., Ura Y., Watanabe T., and Furukawa K.**, “Directed Evolution of Biphenyl Dioxygenase: Emergence of Enhanced Degradation Capacity for Benzene, Toluene, and Alkylbenzenes”, Journal of Bacteriology, Vol. 183, No. 18, Sept 2001, p. 5441 - 5444.
- **Sumcker R. A. and Cooney J. J.**, “Cytological responses of Cladosporium resinae when shifted from glucose to hydrocarbon medium”, Can. J. Microbiol., 27, 1981, p. 1209- 1218.
- **Toren, Orr E., Paitan Y., Ron E. Z., and Rosenberg E.**, “The Active Component of the Bioemulsifier Alasan from Acinetobacter radioresistens KA53 Is an OmpA-Like Protein”, Journal of Bacteriology, Vol. 184, No. 1, Jan. 2002, p. 165-170.
- **Trudgill P. V.**, “Microbial metabolism of monoterpenes- recent developments”, Biodegradation, 1, 1990, p. 93-105.
- **Truffaut N., Mater D., Hallier-Soulier S., Poupin P.**, “Outils moléculaires d'évaluation des capacités dégradatives de microflores de l'environnement”, Bull.Soc.Fr.Microbio., Vol. 16, No. 3, oct 2001, p. 190- 196.

- **Ulfig K., Plaza G., Lukasik K., Manko T., Worsztynowicz A., Tien A., Hazen T.C.,** “Microbiological changes in petroleum-contaminated soil during bioremediation at a polish petroleum refinery”, Fourth International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe. Warsaw, 15-17.09. 1998.
- **Ulfig K., Plaza G., Tien A. J., Worsztynowicz A., Hazen T. C., Altman D.,** “Microbiological Aspects of Bioremediation”, International Containment & Remediation Technology, June 2001 in Orlando, Florida.
- **UP (Union pétrolière),** “ Pétrole: matière première et produits ”, 2004, [www.erdoel.ch/doc/980693996017032004.pdf](http://www.erdoel.ch/doc/980693996017032004.pdf)
- **UP (Union pétrolière),** “ Pétrole: origine, production et traitement ”, 2003, [www.erdoel.ch/doc/229808986217032004.pdf](http://www.erdoel.ch/doc/229808986217032004.pdf)
- **van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B.,** “Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment”, Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP, Vol. 58, No. 4, 2003, p. 427-440.
- **Van Hamme J. D. et. Ward O. P.,** “ Physical and Metabolic Interactions of Pseudomonas sp. Strain JA5-B45 and Rhodococcus sp. Strain F9-D79 during Growth on Crude Oil and Effect of a Chemical Surfactant on Them”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 10, Oct. 2001, p. 4874–4879.
- **Vandecasteele J. P., Ballerini D.,** “Biodégradation des hydrocarbures et xenobiotiques et biorestauration des eaux et des sols pollués”, Bull.Soc.Fr.Microbio., Vol. 16, No. 3, oct 2001, p.183.
- **Vandecasteele J. P., Fayolle F., Marchal R., Chauvaux S., Beguin P., Monot F.,** “Biodégradation des produits pétroliers. Le cas des essences et des éthers - carburants”, Bull.Soc.Fr.Microbio., Vol. 16, No. 3, oct 2001, p. 184- 189.
- **Vila J., López Z., Sabaté J., Minguillón C., Solanas A. M., and Grifoll M.,** “Identification of a Novel Metabolite in the Degradation of Pyrene by Mycobacterium sp. Strain AP1: Actions of the Isolate on Two- and Three-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 12, Dec 2001, p. 5497-5505.
- **Vogel T. et Ballerini D.,** “Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés”, Bull.Soc.Fr.Microbiol., Vol. 16, N°. 3, oct 2001, p. 204- 209.
- **Wang R. F., Wennerstrom D., Cao W. W., KHAN A. A., and Cerniglia C. E.,** “Cloning, Expression, and Characterization of the katG Gene, Encoding Catalase-Peroxidase, from the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium Mycobacterium sp. Strain PYR-1”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 10, Oct. 2000, p. 4300–4304.
- **Watkinson R. J.,** “Interaction of microorganisms with hydrocarbons”, In: Hydrocarbons in Biotechnologie, D. E. F. Harrison, I. J. Higgins and R. J. Watkinson (eds), Heyden, London, 1980, p. 11- 24.
- **Whyte L. G., Hawari J. , Zhou E., Bourbonnière L., Inniss W. E., Greer C. W.,** “Biodegradation of Variable-Chain-Length Alkanes at Low Temperatures by a Psychrotrophic Rhodococcus sp.”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, No. 7, 1998, p. 2578–2584.

- **Xu R. et Obbard J. P.**, “Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oil-Contaminated Beach Sediments Treated with Nutrient Amendments”, J. Environ. Qual, 2004, Vol. 33, p.861-867.
- **Yeung P. Y., Johnson R. L., Xu J. G.**, “Biodégradation of pétroleum hydrocarbons in soil as affected by heating and forced aeration”, J. Environ. Qual, Vol. 26, 1997, p. 1511-1516.
- **Yu S. H., Ke L., Wong Y.S., Tam N.F.Y.**, “Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments” Environment International, 31, 2005, p. 149- 154.
- **Yu Z., Stewart G. R., and. Mohn W. W.**, “Apparent Contradiction: Psychrotolerant Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated Arctic Tundra Soils That Degrade Diterpenoids Synthesized by Trees”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 12, Dec. 2000, p. 5148–5154.
- **Zorzi L. et Heyen G.**, “L'industrie pétrolière: du produit naturel au carburant avancé”, 2001, <http://cheng00.chim.ulg.ac.be/users/GHeyen/IngenieurEnergie/Petrole.doc>
- **Zylstra G. J. et Gibson D. T.**, "Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1 Nucleotide Sequence of The *TodC1C2BADE* Genes and their Expression In *Escherichia Coli*", The Journal of Biological Chemistry, Vol 264, No. 25, 1989, p. 14940-14946.

Autres références électroniques consultées et citées :

- <http://www.qfa.ql.ca/>
- <http://fr.encyclopédia.yahoo.com/articles/>
- <http://strategis.ic.gc.ca/>
- <http://www.pacac.cci.fr/ARIST/>
- <http://www.recy.net/modules/SSP/>
- <http://www.mine.pollution.sols.free.fr/Eipr/>
- <http://www.enviro.lu/France/Depollution.html>
- <http://www.on.ec.gc.ca/pollution/ecnpd/>
- <http://www.kluyver.stm.tudelft.nl/efb/home.htm>
- <http://www.biorem.net/>
- <http://www.enviroaccess.ca/>
- <http://www.bordeaux.inra.fr/>
- <http://rhodia-eco-services.com/>