

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**  
**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**  
**Département de Biologie**



**Mémoire de fin d'études**  
En vue de l'obtention du diplôme de master  
master  
En Ecologie et environnement  
Spécialité : Biodiversité et environnement

*Thème :*

**Etude de l'effet de la contamination du  
sol par les carburants sur des propriétés  
biologiques**

**Présenté par :** Makhloufi hadjer  
Matmer ryma

**Devant le jury :**

Présidente : Mme Ali Ahmed Sadoudi D.  
Promotrice : Mlle Ali Ahmed S.  
Examinatrice : Mme Lamri T.

Professeur à L'U.M.M.T.O  
M.A.A. à L'U.M.M.T.O  
M.A.A. à L'U.M.M.T.O

Soutenu publiquement le : 15-07-2018

## **Remerciement :**

*En préambule à ce mémoire nous remercions Dieu qui nous a aidées et nous a données la patience et le courage durant ces longues années d'étude.*

*Nous tenons à remercier sincèrement Melle Ali Ahmed S. Maitre-assistante au département de Biologie à l'UMMTO qui, en tant qu'encadreur, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer durant nos années d'étude et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Nous voulons vraiment la remercier car nous avons eu beaucoup de chance de l'avoir comme promotrice.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement les membres du jury qui nous ont honorés qui ont consacré du temps pour examiner ce travail ;*

*À la présidente Mme Ali Ahmed-Sadoudi D. Professeur au département de Biologie à l'UMMTO, merci pour les efforts qu'elle a fourni durant notre cursus.*

*À Mme Lamri T., Maitre-assistante au département de Biologie à l'UMMTO, pour nous avoir accordé l'accès au laboratoire de pédologie où nous avons réalisé une partie de notre travail.*

*Nous remercions infiniment Mr Amrani S., Professeur au département de Biologie à l'USTHB pour son aide si précieuse.*

*Merci également à toutes les personnes travaillant au laboratoire "pathologie des écosystèmes" de la FSBSA, particulièrement Melle Abrous H., ainsi que les ingénieurs des laboratoires communs (1) et (2), pour leur soutien et leur assistance.*

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent aussi à Mme Bouabdallah S. qui nous a accordées l'accès au laboratoire de chimie et à Mme Kara H. pour nous avoir assistées.*

*Enfin, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants qui nous ont formées et contribué à notre réussite.*

*Makhloufi hadjer  
Matmer ryma*

## ***Je dédie ce mémoire :***

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

*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 mes frères et sœurs : Rachid, Salah, Imane et Asma qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.*

*A ma belle famille et mon cher fiancé.*

*Sans que je n'oublie notre petit neveu Zakaria.*

*A ma grande famille, grands et petits.*

*A mes chères copines : Ryma , Ghania ,Rosa ,Ghenima et Imane.*

*A tous mes ami(e)s de la promotion.*

*Makhloufi hadjer*

## *Dédicace*

*A mon père et ma mère à qui je dois tout, puisque c'est grâce à eux si j'ai atteint les objectifs que je m'étais fixé. Leur entière disponibilité, leur soutien moral ainsi que leurs encouragements m'ont permis tout au long de mes études, de persévérer, de me surpasser et d'aller de l'avant. J'aimerais les remercier pour la confiance qu'ils ont placé en moi, en sachant que « merci » ne suffira jamais à compenser les efforts et les sacrifices consentis pour ma réussite. Pour mes parents j'aimerais témoigner ma plus profonde reconnaissance et gratitude. J'espère que ma réussite dans les études répondra à leur attente et les comblera de joie et de fierté.*

*A mes sœurs Amira et Imane et mon frère Sofiane je vous remercie pour votre soutien et votre encouragement durant mes études.*

*A ma belle sœur Loulouche et ma petite nièce Nelia qui vient d'ouvrir les yeux au monde.*

*A ma belle famille et à mon cher époux.*

*A mon beau frère karim et sa famille .*

*Ainsi qu'à tous mes amis particulièrement :Hadjer, Ghania, Rosa, Fadhila et Saliha vous êtes les meilleures.*

*Matmer ryma*

# Liste des abréviations

A : Absorbance

BOFAS : Fonds d'assainissement des sols des stations-service

C : Contaminé

CAT : Catalase

DHO : Déshydrogénase

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HC : Hydrocarbures

INRF : Institut national de recherche forestière

MO : Matière organique

NC : Non contaminé

PPO : Polyphenoloxydase

POD : Peroxydase

F : Fumigé

NF : Non fumigé

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Schéma d'une station-service .....	4
<b>Figure 2</b> : Protocole de mesure de la respiration microbienne du sol .....	18
<b>Figure 3</b> : Protocole de fumigation-extraction.....	19
<b>Figure 4</b> : Protocole de dosage du carbone.....	21
<b>Figure 5</b> : Protocole de dosage de la DHO.....	22
<b>Figure 6</b> : Protocole de dosage de la PPO.....	23
<b>Figure 7</b> : Protocole de dosage de la POD.....	24
<b>Figure 8</b> : Protocole de dosage de la CAT.....	25
<b>Figure 9</b> : Protocole de l'extraction des hydrocarbures résiduels.....	25
<b>Figure 10</b> : Dégagement de CO <sub>2</sub> cumulé en 7 jours dans le sol contaminé (C) et non contaminé (NC).....	28
<b>Figure 11</b> : Taux de minéralisation du carbone dans le sol contaminé et non contaminé.....	29
<b>Figure 12</b> : Biomasse microbienne dans les sols contaminé et non contaminé.....	30
<b>Figure 13</b> : Activité de la DHO dans les sols contaminé et non contaminé .....	31
<b>Figure 14</b> : Activité de la PPO dans les sols contaminé et celui non contaminé.....	32
<b>Figure 15</b> : Activité de la POD dans les sols contaminé et non contaminé.....	32
<b>Figure 16</b> : Activité de la CAT dans les sols contaminé et non contaminé.....	33
<b>Figure 17</b> : Quantités des HC totaux dans les sols contaminé et non contaminé.....	34
<b>Figure 18</b> : Taux de germination des grains de maïs dans les sols contaminé et non contaminé .....	36
<b>Figure 19</b> : Taux de germination des grains de laitue dans un sol contaminé et non contaminé.....	37
<b>Figure 20</b> : Elongation racinaire de maïs dans un sol contaminé et non contaminé.....	38
<b>Figure 21</b> : Elongation racinaire de laitue dans un sol contaminé et non contaminé.....	39



## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Comparaison entre les caractéristiques de l'essence et du gasoil.....	05
<b>Tableau II :</b> Les principales enzymes du sol (origine, rôle).....	14
<b>Tableau III :</b> Les caractéristiques du sol de la station-service de Boukhalfa.....	16
<b>Tableau IV :</b> Résultats obtenus par la spectroscopie.....	35

# **Sommaire**

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

## Sommaire :

Introduction générale.....1

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.Contamination du sol par les hydrocarbures .....	3
I.1. la pollution du sol par les hydrocarbures .....	3
I.2. Les principales sources de contamination du sol par les hydrocarbures .....	3
I.3. Devenir des hydrocarbures dans le sol .....	6
II.Effets écotoxicologiques des hydrocarbures .....	7
II.1. Effets sur les propriétés physiques du sol .....	8
II.2. Effets sur les propriétés chimiques du sol.....	8
II.3. Effets sur les propriétés biologiques du sol .....	8
II.4. Effets sur le végétal .....	11
III.Rôle du sol dans l'élimination des hydrocarbures .....	12
III.1. Le rôle des plantes.....	12
III.2. Le rôle des microorganismes.....	12
III.3. Le rôle de l'activité enzymatique.....	12

### Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Matériels.....	16
I.1. Le sol .....	16
I.2. Matériel végétal.....	16
II. Méthodes .....	17

II.1. Les indicateurs biologiques de la qualité du sol.....	17
II.2. Analyse des hydrocarbures .....	26
II.3. Tests écotoxicologiques.....	26
III. Analyse statistique.....	27

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

I. Résultats.....	28
I.1. Effets des hydrocarbures sur les paramètres biologiques du sol .....	28
I.2. Analyse des hydrocarbures .....	34
I.3. Effets des hydrocarbures sur le végétal .....	37
II. Discussions.....	39
Conclusion et perspectives.....	43
Références bibliographiques	
Liste des annexes	
Résumé	

# **Introduction générale**

L'environnement constitue aujourd'hui un thème majeur d'actualité touchant les domaines sociaux, économiques et législatifs. L'effet de la pollution sur les différents domaines environnementaux est rarement mis en évidence (Turgay *et al.*, 2010).

Depuis le siècle dernier et jusqu'à nos jours, l'importance de l'industrie pétrolière n'a cessé de croître et ceci grâce au rôle stratégique et politique que le pétrole joue sur la scène mondiale (Soltani, 2004). Ce dernier est considéré, non seulement comme la matière première pour l'industrie chimique, mais également comme source d'énergie la plus demandée.

En Algérie, l'exploitation des gisements de pétrole n'a fini d'augmenter ces dernières années (Sonatrach, 2010) et constituent généralement les principaux contaminants à la fois pour les écosystèmes aquatiques et terrestres. La pollution par les hydrocarbures occupe au sein de la préoccupation environnementale une place particulière, qui est due à leur rémanence et leur toxicité. Cette contamination est susceptible d'une bioaccumulation dans les chaînes alimentaires, en présentant des toxicités pour le végétal, l'animal et des risques pour la santé humaine (Soltani, 2004).

Les stations-service sont une source importante de contamination du sol, qui peut être chronique, se produisant sur une longue période et étant due le plus souvent à la corrosion des cuves et des canalisations enterrées, points de remplissage, ilots des pompes,... ou accidentelle lorsqu'elle est due aux fuites de carburants des cuves de stockage (Patej, 2002). D'après l'agence de NAFTAL de la wilaya de Tizi-Ouzou (2018), 86 stations-service fonctionnelles sont implantées dans la wilaya. Celle de Boukhalfa est considérée comme étant la plus consommatrice d'essence super et de gasoil. Les quantités distribuées dans cette station arrivent parfois jusqu'à trois camions de 20 mille l du gasoil et de 7 mille l d'essence super par jour, ce qui augmente le risque de contamination surtout qu'elle est située à proximité d'un cours d'eau et qu'elle soit entourée par des terres agricoles. C'est pour cette raison qu'on s'intéresse actuellement à évaluer les effets qui peuvent être engendrés par de tels polluants en utilisant des analyses permettant de donner plus d'informations sur la qualité biologique du sol afin de trouver la technique de décontamination la plus adéquate.

Les hydrocarbures ont été l'objet de plusieurs études afin de quantifier leur impact sur les paramètres physiques (texture, densité, etc.) et chimiques (MO, pH, C, N, P, etc.) (Doran et Safley, 1997), notamment des travaux réalisés à l'UMMTO (Amiri, 2013 ; Henine et Hasnaou, 2014). Actuellement les études se sont orientées vers une approche biologique plus

apte à interpréter la qualité d'un sol (Bastida *et al.*, 2008). C'est dans cette optique que s'inscrit notre étude.

En général les indicateurs biologiques du sol jouent un rôle important dans l'évaluation et la remédiation des dangers (Dawson *et al.*, 2007). Les indicateurs les plus utilisés pour les sols contaminés sont les bio-essais (Maila et Cloete, 2005), la biomasse microbienne (Gil-Sotres *et al.*, 2005), la respiration microbienne exprimée par le dégagement de CO<sub>2</sub> (Bastida *et al.*, 2008) et l'activité enzymatique liée elle-même à la MO et à l'activité microbienne (Knight et Dick, 2004).

L'activité enzymatique du sol fournit des indications fiables et utiles sur la santé du sol pollué ou restauré à court et à long terme et permet d'évaluer sa qualité biologique. Elle présente l'avantage d'être facile et rapide pour détecter la pollution par les hydrocarbures. Elle est souvent utilisée comme un outil de surveillance dans le processus de décontamination d'un sol pollué (Turgay *et al.*, 2010).

L'objectif du présent travail consiste à étudier l'effet de la contamination du sol par les carburants sur ses propriétés biologiques en évaluant des paramètres faciles à mesurer (biomasse microbienne, respirométrie, activité enzymatique et fertilité). Il s'agit également d'évaluer la pertinence de l'activité enzymatique comme indicateur de la contamination du sol par les carburants.

Le présent mémoire se subdivise en trois chapitres. Le premier présente le cadre général de l'étude notamment des rappels bibliographiques sur la pollution du sol par les hydrocarbures et leurs impacts sur les propriétés de ce dernier. La connaissance de l'origine des enzymes et leur rôle a été également signalé dans cette partie bibliographique. Le deuxième consiste en la présentation de l'ensemble de matériel utilisé ainsi que les différentes méthodes et protocoles utilisés dans notre expérimentation. Le troisième chapitre est consacré à la présentation et à la discussion des résultats obtenus. Le mémoire se termine par une conclusion et quelques perspectives de recherche.

**Chapitre I :**  
**Synthèse**  
**bibliographique**

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

### I. Contamination du sol par les hydrocarbures :

Les hydrocarbures constituent l'une des matières premières les plus convoitées de la planète, grâce à leur importance dans le processus de développement, mais ils ont des effets dévastateurs sur l'environnement.

#### I.1. la pollution du sol par les hydrocarbures :

Les hydrocarbures sont parmi les substances polluantes les plus répandues dans l'environnement (Mochalova *et al.*, 2002). Selon Haritash et Kaushik (2009), les sols constituent leur réservoir ultime. C'est une classe de produits chimiques organiques dangereux (Eriksson *et al.*, 2003); et on estime qu'il y a pollution par les hydrocarbures (HC) lorsque l'action de ceux-ci peut être considérée comme néfaste aux conditions de vie de l'homme directement, ou indirectement, si elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles (Bertrand et Mille, 1989 *in* Guermouche M'rassi, 2014).

#### I.2. Les principales sources de contamination du sol par les hydrocarbures :

La plupart des contaminants organiques sont générés par l'activité humaine. Néanmoins, certains contaminants peuvent avoir une origine naturelle.

##### I.2.1. Les sources naturelles :

Ce sont les incendies de forêts, de prairie (Barriuso *et al.*, 1996), les éruptions volcaniques, mais ils sont aussi produits par les végétaux, essentiellement les hydrocarbures aliphatiques, qui se trouvent, dans les cires des végétaux supérieurs ou par les algues, les résines et les déchets microbiens. Selon Lemièrre *et al.* (2001), certains des HC tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) peuvent avoir une origine naturelle (ex : sols des forêts de sapins ou de hêtres autour des lacs).

##### I.2.2. Les sources anthropiques :

En plus des sources naturelles mineures, les sources anthropiques sont majoritaires (Thiele et Brümmer, 2002 ; Wilcke, 2007). Elles sont liées aux activités industrielles, urbaines et énergétiques tels que le processus de production et de dispersion de matières créosotées (chemins de fer), les industries des HC et associé(e)s (brai de goudron, asphalte et épandage de boues) (Whitacre *et al.*, 2008 *in* Técher, 2011); les accidents de la route, la mise en décharge non contrôlée (Chaineau *et al.*, 2000); les retombées atmosphériques dans les zones urbaines et

industrielles ou leur périphéries (HC volatils, imbrulés de combustions diverses) (Bocard, 2006); fuites d'oléoducs et de cuves enterrées, industrielles (station-service par exemple).

D'après Crepineau *et al.* (2003), au regard des quantités d'HC contaminant les sols, leur concentrations peuvent être importantes à proximité de la source émettrice, elles diminuent de manière exponentielle en fonction de la distance de ce site.

### I.2.3. Cas des stations-service :

Dans une station-service, on manipule du carburant (essence ou diesel). Il s'agit d'une activité à risque vu le stockage et la manipulation de ces produits hautement polluants pour le sol. D'après Colin (2000), la pollution par les HC légers couramment commercialisés (essence, kérosène, gasoil, solvants) est très fréquente du fait de leur utilisation généralisée.

Les stations-service contribuent donc en grande partie à la pollution ponctuelle, du fait de l'infiltration des carburants dans les sols lors d'une fuite dans un réservoir ou dans une tuyauterie ou en cas d'accident lors du remplissage des citernes ou du réservoir des véhicules (fig. 1). Même de petites quantités peuvent contaminer la couche supérieure ou inférieure du sol (BOFAS, 2004). Les lubrifiants (huiles, graisses, liquides de freins) peuvent aussi provoquer une pollution du sol.

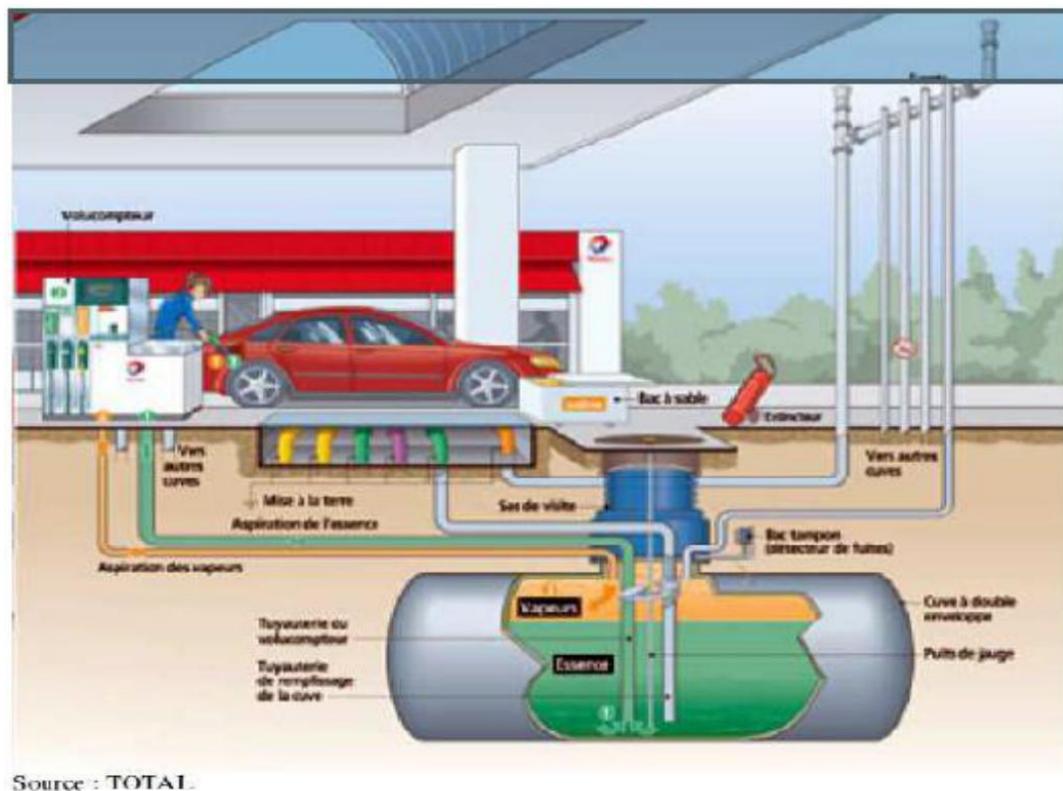


Fig. 1 : Schéma d'une station-service (Carnicer, 2007)

**1.2.3.1. Les carburants: Essence et gazole**

Ce sont des mélanges complexes d'HC pétroliers leur composition dépend de facteurs comme l'origine du pétrole brut soumis au raffinage et les conditions de raffinage. Une comparaison des principales caractéristiques de ces carburants est présentée dans le tableau I.

**Tableau I :** Comparaison entre les caractéristiques de l'essence et du gasoil.

Gazole	Références	Essence	Références
Se compose de chaînes d'hydrocarbures de 11 à 25 atomes de carbone	(Saada <i>et al.</i> , 2005).	Se compose principalement de chaînes d'HC de 4 à 10 atomes de carbone	(Saada <i>et al.</i> , 2005).
Distillé entre 180 et 380 °C	(Saada <i>et al.</i> , 2005).	Distillée entre 30 et 200°C	(Saada <i>et al.</i> , 2005).
Densité de 0,82 à 0,86	(Saada <i>et al.</i> , 2005).	Densité de 0,72 à 0,77	(Soltani, 2004),
2000 à 4000 HC différents ne contiennent pas d'alcènes	(Ogbo, 2008)	environ 230 composants d'HC	(Saada <i>et al.</i> , 2005).
Plus lourds que les essences et composés de produits moins volatiles avec une proportion plus importante d'aromatiques	(Saada <i>et al.</i> , 2005).	Composée des n-alcanes, iso-alcanes, cyclo-alcanes, alcènes et aromatiques	(Saada <i>et al.</i> , 2005).

### **I.3. Devenir des hydrocarbures dans le sol :**

Le devenir d'un contaminant est contrôlé par les propriétés physicochimiques du composé et par la nature et la composition du milieu dans lequel le composé est en migration. Plus le nombre d'atomes de carbone n'est pas important, plus la solubilité, la volatilité et la biodégradabilité sont faibles ; au contraire, l'adsorption sera importante pour une molécule présentant un grand nombre d'atomes de carbone (Saada *et al.*, 2005).

#### **I.3.1. Volatilisation :**

Elle dépend de la pression de vapeur de chaque composé (à partir d'une pression de vapeur supérieure à 133 Pa le produit est relativement volatile), et des propriétés du sol, plus l'humidité du sol est grande, plus la quantité de pores disponibles pour le passage des vapeurs est faible, le grand diamètre des pores favorise d'importants transferts de masse de vapeur vers l'atmosphère (Saada *et al.*, 2005). Ce mécanisme dépend aussi de la constante de Henry (Hanna, 2004), lorsque celle-ci dépasse  $100 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ , les composés se volatilisent facilement.

#### **I.3.2. Solubilisation :**

Elle influence surtout la mobilité des polluants dans les sols (Mccray *et al.*, 2001). Généralement les carburants sont des composés insolubles dans l'eau mais certains d'entre eux peuvent partiellement se dissoudre (HAP et HC à faible nombre d'atomes de carbone) ceux-ci figurent parmi les hydrocarbures les plus dangereux pour l'environnement et les plus difficiles à éliminer. Ils sont plus solubles lorsque leur masse moléculaire est faible et que leur polarité est élevée (Soltani, 2004).

#### **I.3.3. Sorption (adsorption) :**

C'est la capacité de certains corps solides de retenir les molécules d'autres corps (à l'état gazeux ou liquide) à leur surface. Selon Saada *et al.* (2005), les milieux riches en MO et/ou en minéraux fins (granulométrie  $< 2 \mu\text{m}$ ) sont les plus favorables à ce mécanisme. Dans le cas des HAP, elle peut avoir lieu sur toutes les surfaces des différentes phases solides du sol; minime sur les particules minérales, et très importante sur la MO (Murphy *et al.*, 1990).

#### **I.3.4. Dégradation :**

Il peut s'agir d'une dégradation abiotique (photolyse, réaction d'oxydo-réduction, hydrolyse) ou biotique (biodégradation).

### **I.3.4.1. Dégradation abiotique :**

Elle réfère à trois processus principaux :

L'hydrolyse est un processus de dégradation des molécules par l'action de l'eau sur un polluant dans les phases aqueuses des milieux, consécutive à la dissociation ionique de l'eau, il est fortement influencé par le pH et la température du sol (Hanna, 2004).

La photo-oxydation peut avoir lieu dans les sols en surface, elle dépend de la nature des HC et les conditions rédox. et touche plus particulièrement les composés aromatiques que les composés aliphatiques tels que les composés ramifiés (Wilcke *et al.*, 2000).

La photolyse dans le sol n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface (Park *et al.*, 2001), c'est une décomposition chimique (oxydation) des HC sous l'effet de la lumière. Après absorption de l'énergie, la molécule est déstabilisée et peut réagir généralement avec O<sub>2</sub> pour former une molécule oxydée (Lampi, 2005).

### **I.3.4.2 Dégradation biotique :**

C'est une transformation des composés carbonés en différents sous-produits, par des microorganismes présents dans le sol, ces derniers s'en nourrissent et produisent des enzymes qui vont réagir avec les molécules d'HC pour les transformer en sous-produits plus simples, généralement le CO<sub>2</sub> et le H<sub>2</sub>O lorsque la dégradation est complète (Rivière, 1998a).

D'après Chaineau *et al.* (1996) la dégradation de ces composés dépend de leur structure chimique et des facteurs environnementaux, tels que la température, l'humidité, l'oxygène disponible, le pH et la salinité (Stegmann *et al.*, 2001). Plus la masse molaire ou le nombre de cycles augmente, plus la vitesse de biodégradation diminue (Saada *et al.*, 2005).

Les micro-organismes assurent une ou plusieurs modifications structurales du polluant (dégradation) qui ne sert pas de source d'énergie. La présence d'un co-substrat permettant la croissance est alors nécessaire. Différents types de micro-organismes peuvent intervenir successivement (notion de communauté dégradante) et la dégradation du polluant peut être complète dans ces conditions (Zhang *et al.*, 2010).

## **II.Effets écotoxicologiques des hydrocarbures :**

La pollution par les HC pose d'importants problèmes dans l'environnement vis-à-vis des microorganismes, des plantes, des animaux et de la santé humaine. En raison de leur caractère liposoluble peuvent s'accumuler dans la faune et la flore et tout au long de la chaîne trophique (Ramade, 2007).

Comme pour tous les xénobiotiques l'existence et l'ampleur de cette action nocive varient suivant (Colin, 2000 ; Zhang *et al.*, 2010) :

- La nature et la structure chimique des hydrocarbures ;
- La concentration des hydrocarbures ;
- La durée du contact ;
- Les cibles biologiques concernées (degré de sensibilité).

### **II.1. Effets sur les propriétés physiques du sol :**

Après une recherche bibliographique, peu d'étude ont été réalisées dans le but de déterminer l'effet des carburants sur les propriétés physiques du sol. Néanmoins, quelques observations intéressantes ont été faites par certains auteurs. Rouquerol *et al.* (1987) ont montré que les HC enrobaient les particules minérales et assuraient leur dispersion. Sutton *et al.* (2013) soutiennent, quant à eux, l'idée que la présence de ces polluants améliore la stabilité structurale du sol, accroît sa rétention en eau.

Cependant, d'autres auteurs (Onojake et Osuji, 2012) ont démontré que l'humidité et la capacité de rétention de l'eau est considérablement réduite par les HC ce qui entrave la circulation de l'air et de l'eau dans la matrice du sol et donc réduit l'infiltration de l'eau dans le sol.

### **II.2. Effets sur les propriétés chimiques du sol :**

Les effets qui peuvent être générés lors d'une contamination par les HC sur les propriétés chimiques sont :

- une augmentation de la concentration du sol en élément à l'état traces tels que le manganèse, le zinc, le fer et le plomb (Degranges *et al.*, 1977) ;
- une baisse de la valeur du pH a été observée par Degranges *et al.* (1977), Chaineau *et al.* (1996) et Agele (2017) qui ont observé une augmentation de l'acidité du sol suite à la contamination chronique du sol par ce polluant ;
- une disponibilité réduite d'azote, de phosphore, de cations échangeables (potassium et calcium) suite à la diminution du pH du sol (Rouquerol *et al.*, 1987 ; Chaineau *et al.*, 1996) ;
- une augmentation de la teneur en carbone organique total du sol qui peut être le résultat de la minéralisation microbienne des composés d'HC (Chaineau *et al.*, 1996) .

### **II.3. Effets sur les propriétés biologiques du sol :**

L'étude de l'effet des carburants sur les propriétés biologiques suscite de plus en plus d'intérêt ces années dernières car l'évaluation d'un tel impact permet aux chercheurs de trouver des solutions aptes à remédier les sols.

#### **II.3.1. Effets sur les micro-organismes :**

Même s'il leur est reconnu un effet inhibiteur envers certains microorganismes, des études ne cessent d'attribuer aux HC des effets positifs sur la microflore du sol.

Dommegues et Mangenot (1970), Rouquerol et ses collaborateurs (1987) et Rivière (1998 b) ont affirmé qu'un sol imprégné par les HC présentait un très grand nombre de germes (bactéries, actinomycètes, champignons et levures) revivifiables avec des coefficients de minéralisation élevés qui tendent à épuiser le sol des éléments nutritifs.

Selon Duchaufour (2001) et Sulaiman *et al.* (2015), les HC incorporés au sol en quantité limitée n'exercent pas d'action dépressive vis-à-vis des microorganismes du sol. De ce fait l'ajout de l'essence aux sols peut constituer une source importante de carbone pour la croissance et l'activité microbiennes.

Il faut toutefois prendre ces résultats avec beaucoup de réserve car d'autres travaux menés sur ces polluants ont révélé des effets dépressifs sur la microflore du sol (Serrano *et al.*, 2009 ; Ifemeje et Egbuna, 2016). Il est également possible que la dégradation des carburants de plus haut poids moléculaire produise des intermédiaires toxiques capables d'inhiber les micro-organismes dégradant le gasoil (Agele *et al.*, 2017).

#### **II.3.2. Effets sur les activités enzymatiques :**

L'expression des activités enzymatiques à la suite d'une contamination par les HC est fonction de la nature du sol, des propriétés de ces HC telles que leur degré de solubilité dans la solution du sol et la quantité de cycles benzéniques dans les molécules (Dick, 1997 ; Maliszewska-Kordybach et Smreczak, 2003).

##### **II.3.2.1. Effets stimulant les enzymes :**

Plusieurs auteurs affirment qu'une contamination du sol par les HC tend à bouleverser l'équilibre biologique du sol. Elle modifie généralement la succession des micro-organismes, augmente le nombre de micro-organismes grâce à l'adaptation et la forte relation positive qui existe entre les bactéries hétérotrophes et les carburants. Ces polluants peuvent avoir une action positive sur l'activité microbienne en induisant une production plus élevée d'enzymes (Wyszkowska *et al.*, 2006 ; Dindar *et al.*, 2015).

Les résultats de Timmerman *et al.* (2002) confirment qu'une contamination par les HC provoque une augmentation significative des propriétés biologiques du sol telles que la biomasse microbienne, et l'activité enzymatique. D'après Sulaiman *et al.* (2015), la teneur en HC de faible poids moléculaire dans les sols influe positivement sur les microorganismes ainsi que sur la synthèse de la Déshydrogénase (DHO). De leur côté, Pérez-Leblic *et al.* (2012) ont observé une augmentation significative de l'activité de la catalase (CAT) suite à une faible contamination du sol par les carburants par rapport à un sol non contaminé. Selon Tang *et al.* (2010), les champignons secrètent la Peroxydase (POD) dans le cas d'une pollution du sol. Même en cas de contamination chronique par les HC (en particulier le diesel), les activités enzymatiques d'hydrolases (uréase, protéase, arylsulfatase et  $\beta$ -glucosidase) augmentent (Labud *et al.*, 2007).

### **II.3.2.2. Effets inhibiteurs des enzymes :**

Les résultats obtenus par Gianfreda *et al.* (2005) montrent que la contamination par les HC inhibait les activités enzymatiques du sol et que l'étendue de cette inhibition augmente significativement avec l'augmentation des niveaux des carburants. Selon Serrano *et al.* (2009), le gasoil avait l'effet inhibiteur le plus élevé parmi les autres hydrocarbures sur les activités enzymatiques du sol telles que l'uréase et les phosphatases. La présence des HAP dans le sol a provoqué une inhibition de la POD et de la CAT, résultat de l'effets toxique direct de ces polluants sur les micro-organismes sensibles mais aussi de l'effet indirect de la détérioration des propriétés physiques du sol (Malachowska *et al.*, 1997).

Dans l'ensemble, lorsque les HC (gazole , essence ) sont présents dans le sol, ils créent des conditions inadéquates pour les organismes du sol, principalement en raison de la mauvaise aération, de l'immobilisation des nutriments et de l'abaissement du pH du sol qui aboutit à une réduction du nombre de microorganismes et de l'activité enzymatique (Rao *et al.*, 2015) .

Les enzymes, telles que les DHO et les POD se sont révélées à plusieurs reprises être des indicateurs particulièrement sensibles aux perturbations liées aux HC (Mohsenzadeh *et al.*, 2012).

### II.3.3. Effets sur la faune :

Les sols contaminés par les HC présentent un danger lors du contact direct avec l'animal ou lors de leur transfert dans la chaîne alimentaire qui est un phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Zhang *et al.*, 2010).

Les effets écotoxiques de la pollution par les carburants se traduisent par des altérations biologiques tant aux niveaux moléculaires que populationnels. L'augmentation de l'activité des microbes anaérobies suite à un déversement des HC (gasoil) augmente le stress pour les organismes vivants et les animaux du sol tels que les vers de terre (Andreoni *et al.*, 2004 ; Alrumman *et al.*, 2015) , les nématodes (*Rhabditis spp.* et *Xiphinema spp.*) , les arthropodes (Hamdi *et al.*, 2007), contrairement aux collemboles et aux gastéropodes qui ont un fort caractère d'adaptation vis à vis de ces substances, et qui sont souvent utilisés comme bioindicateurs (Bachelier, 1978 ; Amireche, 2014).

### II.4. Effets sur le végétal :

Les carburants inhibent le développement de certains végétaux d'où le terme de phytotoxicité des carburants, qui se manifeste par une inhibition de la germination des graines et/ou de la croissance végétative (Wyszkowska *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont montré que la présence de gasoil dans le milieu de croissance d'une plante menait à une diminution de la biomasse des racines, de la longueur/taille des racines, des tiges, et une sénescence prématurée des feuilles et enfin une inhibition de l'activité photosynthétique (Wang et Bertha, 1990, Ammar et Nafil, 2014).

L'effet inhibiteur sur la germination peut être attribué à l'hydrophobie des carburants qui empêche et/ou réduit les échanges d'eau et de gaz (Udo et fayemi, 1975 *in* Chaineau *et al.*, 1997 ; Adam et Duncan, 2002), à l'immobilisation de l'azote contenu dans le sol (Koller, 2004).

Chaineau *et al.* (1997) ont testé la sensibilité de 7 espèces végétales (blé, orge, tournesol, haricot, maïs et laitue) aux HC, il s'est avéré que la fraction légère de ce polluant est plus toxiques pour les cultures que la fraction lourde. La résistance des graines à la contamination a suivi l'ordre décroissant suivant selon ces auteurs :

Tournesol > haricot > trèfle > maïs > orge > laitue

Les résultats des essais biologiques sur la phytotoxicité ont révélé que les espèces fève, riz et luzerne ont un plus grand potentiel de phytoremédiation des sols contaminés par le diesel du fait de leur tolérance vis-à-vis de ce carburant (Mohanty *et al.*, 2010).

### **III. Rôle du sol dans l'élimination des hydrocarbures :**

Les sols sont dotés d'une multitude de fonctions qui influent positivement sur la dégradation des polluants en faisant intervenir des plantes et des microorganismes ainsi que les enzymes.

#### **III.1. Le rôle des plantes :**

Des recherches récentes ont montré que la présence des plantes modifie les propriétés chimiques et biologiques du sol environnant par exsudation et par la présence de microorganismes symbiotiques. La plupart des molécules excrétées dans la rhizosphère peut servir pour la nutrition des microorganismes libres du sol, ce qui encourage la dégradation des contaminants organiques principalement en fournissant un environnement optimal pour la prolifération microbienne dans la rhizosphère notamment par la production d'enzymes (Serrano *et al.*, 2009).

Selon Schnoor *et al.* (2003) ainsi que Martin *et al.* (2013) in Belhocine (2016), les exsudats racinaires peuvent avoir un rôle dans l'amélioration directe de la dégradation des HC via la sécrétion de diverses enzymes extracellulaires.

#### **III.2. Le rôle des microorganismes:**

Dans un sol perturbé, les microorganismes régulent les processus de restauration qui permettent à la vie florale et faunique de recoloniser le sol car elle joue un rôle essentiel dans la décomposition de la matière organique. Pour cela, plusieurs auteurs considèrent que les propriétés microbiologiques du sol servent d'indicateurs utiles de la santé du sol (Sulaiman *et al.*, 2015). En effet Johnson *et al.* (2005) ont constaté que les bactéries essentiellement les *Pseudomonas* sont capables de décomposer les HC par diverses voies métaboliques permettant la dégradation de plusieurs composés aromatiques avec une série d'enzymes.

#### **III.3. Le rôle de l'activité enzymatique :**

Les activités enzymatiques du sol sont considérées comme des paramètres utiles et facile pour fournir une évaluation biologique de la qualité du sol lors de la présence de différentes substances (HC, diesel, métaux lourds) ou en conditions de stress (Andreoni *et al.*, 2004, Alrumman *et al.*, 2015) et comme des indicateurs plus sensibles que d'autres paramètres microbiens dans le cadre d'une contamination aux HC (Dindar *et al.*, 2015).

La présence et l'activité d'êtres vivants dans le sol se traduit par la synthèse d'enzymes de toutes sortes qui sont impliquées dans le fonctionnement des principaux cycles biogéochimiques. Ces enzymes sont localisées à l'intérieur des cellules viables des microorganismes (intracellulaires) ou à l'extérieur des cellules (extracellulaires), adsorbées sur les parois des microbes ou sur les minéraux argileux (Soldatkin *et al.*, 2012). Les enzymes les plus couramment mesurées sont les oxydo-réductases : il s'agit d'enzymes de type "respiratoire" car ce type d'enzyme a une haute capacité de transformer les HC en molécules moins toxiques, dont la plus étudiée est la DHO (Rao *et al.*, 2015). Les principales enzymes, leurs origines et leurs rôles sont résumées dans le tableau II.

Les micro-organismes (bactéries et champignons) sont la principale source d'enzymes dans le sol. Ces enzymes sont les médiateurs et les catalyseurs polyvalents, efficaces et spécifiques de processus biochimiques importants dans le fonctionnement du sol tels que la minéralisation, la formation de la MO et la détoxification ou décomposition des substances xénobiotiques tels que les HC (Knight et Dick, 2004).

Les enzymes peuvent agir comme capteurs d'une molécule spécifique ou de ses sous-produits. Evaluer leur quantité et leur concentration permet d'estimer l'efficacité de la restauration d'un site contaminé. Elles peuvent fournir des tests simples et très sensibles pour détecter une indication initiale de pollution environnementale ou de restauration (Garcia *et al.*, 2011 ; Soldatkin *et al.*, 2012).

**Tableau II** : Les principales enzymes du sol (origine, rôle).

Types d'enzymes	Noms d'enzymes	Origines d'enzymes	Références	Rôles d'enzymes	Références
Oxydo-réductases	DHO	Enzyme intracellulaire	(Klimkowicz-Pawlas et Maliszewska-Kordybach, 2003)	Fournit des informations corrélatives sur les communautés microbiennes du sol ; Joue un rôle important dans l'oxydation biologique du sol contaminé par les HC ; Joue un rôle dans la dégradation des carburants dans le sol ; Souvent utilisé comme capteur et indicateur fonctionnel de la santé du sol.	(Makoi et Ndakidemi, 2008) (Sulaiman <i>et al.</i> , 2015) ; (Gianfreda <i>et al.</i> , 2005).
	PPO	Découvertes initialement dans les champignons largement distribuées dans la nature ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris, les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes.	(Casañola-Martín <i>et al.</i> , 2006).	Intervient dans la conversion des composés organiques aromatiques en fractions humiques ; Catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones (en utilisant les composés phénoliques comme substrats).	(Ding <i>et al.</i> , 2008)  (Liu <i>et al.</i> , 2014)
	POD	Enzymes ubiquitaires retrouvées dans les plantes, les animaux et les microorganismes	(Rao <i>et al.</i> , 2015)	Capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques, en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ou l'hydroperoxyde organique comme accepteur d'électron elles les réduisent en H <sub>2</sub> O	(Mamounata, 2012)

	CAT	Enzyme extracellulaire commune dans presque tous les organismes vivants exposés à l'oxygène, par exemple des enzymes peuvent être excrétées à partir de cellules vivantes ou libérées de cellules mortes	(Liu <i>et al.</i> , 2014)	Capables de transformer les phénols, y compris des composés chlorés et non chlorés toxiques jouent un rôle très important dans la protection de la cellule contre les dommages oxydatifs; une molécule de catalase peut convertir des millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène chaque seconde	(Cabana <i>et al.</i> , 2007 )  (Skujiņš et Burns, 2008).
Hydrolases	Uréase	Enzyme extracellulaire, représentant jusqu'à 63% de l'activité totale du sol	(Martinez-Salgado <i>et al.</i> , 2010)	Joue un rôle important dans la minéralisation de composés azotés organiques du sol. Catalyse la réaction d'hydrolyse de l'urée fertilisante, en libérant de l'azote ammoniacal et du CO <sub>2</sub> .	(Dindar <i>et al.</i> , 2015)
	Arylsulfatase	Une large distribution dans la nature peut se retrouver intra et extracellulaire.	(Elsgaard <i>et al.</i> , 2002)	Responsable des fonctions de minéralisation et du cycle du soufre dans le sol. Son activité dépend d'un certain nombre de facteurs, y compris des quantités de polluants introduits. Son activité est corrélée avec la biomasse microbienne	(Kang et Freeman, 1999)
	β-Glucosidase	Produite par une variété d'organismes (plantes, animaux, bactéries, champignons)	(Knight et Dick, 2004)	Participe à la dégradation des carbohydrates et procure des sources d'énergie et de substrat pour les microorganismes hétérotrophes. Son activité est corrélée avec la biomasse microbienne  impliquée dans l'étape finale de la dégradation de la cellulose pour fournir d'importantes sources d'énergie glucidique aux micro-organismes du sol.	(Knight et Dick, 2004).



# **Chapitre II :**

# **Matériels et méthodes**

**Chapitre II : Matériels et méthodes :**

Afin de déterminer l’effet des carburants (essence super et gas-oil), sur les propriétés biologiques du sol notamment les activités enzymatiques, des expériences ont été entreprises au laboratoire « Pathologie des écosystèmes » de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l’Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

**I. Matériels :**

**I.1. Le sol :**

Dans notre étude, le sol utilisé lors des essais provient d’une station-service de Boukhalfa, située à 36° de latitude et à 4° de longitude, à 5 Km à l’ouest du chef-lieu de la commune de Tizi-Ouzou, sur la route nationale n°12, reliant Alger à Tizi-Ouzou.

D’après les analyses effectuées au laboratoire de pédologie de L’INRF de Bainem, ce sol présente les caractéristiques consignées dans le tableau III.

**Tableau III :** les caractéristiques du sol de la station-service de Boukhalfa (Bourkache et Bousseu, 2015).

Caractéristiques	Sol contaminé	Sol non contaminé
pH	7,2	7,53
CE	0,74 mmhos/cm	0,13 mmhos/cm
Corg	8,84 %	2 %
Ntot	0,3 %	0,44 %
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5,45 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /Kg du sol	10,26
Texture	Limono-argileuse	Limono-argileuse

Les 2 échantillons de sol (l’un contaminé prélevé à proximité de la source de pollution, l’autre non contaminé prélevée dans une parcelle qui n’est pas exposée à cette pollution) ont été prélevés de la couche superficielle (0-15 cm) ont été ensuite conservés au réfrigérateur à 4 °C.

Avant de commencer nos analyses, ces sols ont été sortis du réfrigérateur, séchés puis tamisés à travers un tamis de 2mm de diamètre.

**I.2. Matériel végétal :**

Dans le but de tester la phytotoxicité des HC (germination, élongation racinaire) deux espèces végétales ont été choisies : le maïs et la laitue.

### **I.2.1. Le maïs (*Zea mays*) :**

C'est une plante herbacée robuste annuelle tropicale de la famille des Poacées (graminées) originaire d'Amérique Centrale.

Le choix s'est porté sur ce végétal en raison de sa bonne faculté germinative et elle fait partie des espèces les plus sensibles à la contamination par les HC (Chaineau *et al.*, 1997) et elle est souvent utilisée dans l'évaluation de l'efficacité de la décontamination des sols (Schnoor *et al.*, 2003).

### **I.2.2. La laitue (*Lactuca sativa*) :**

C'est une plante herbacée, de la famille des Astéracées, originaire d'Europe du Sud et d'Asie. Les études de toxicité conduites par Vioko et Fashemi (2005) et Chaineau *et al.* (1997) sur la laitue ont montré sa sensibilité vis-à-vis des HC.

## **II. Méthodes :**

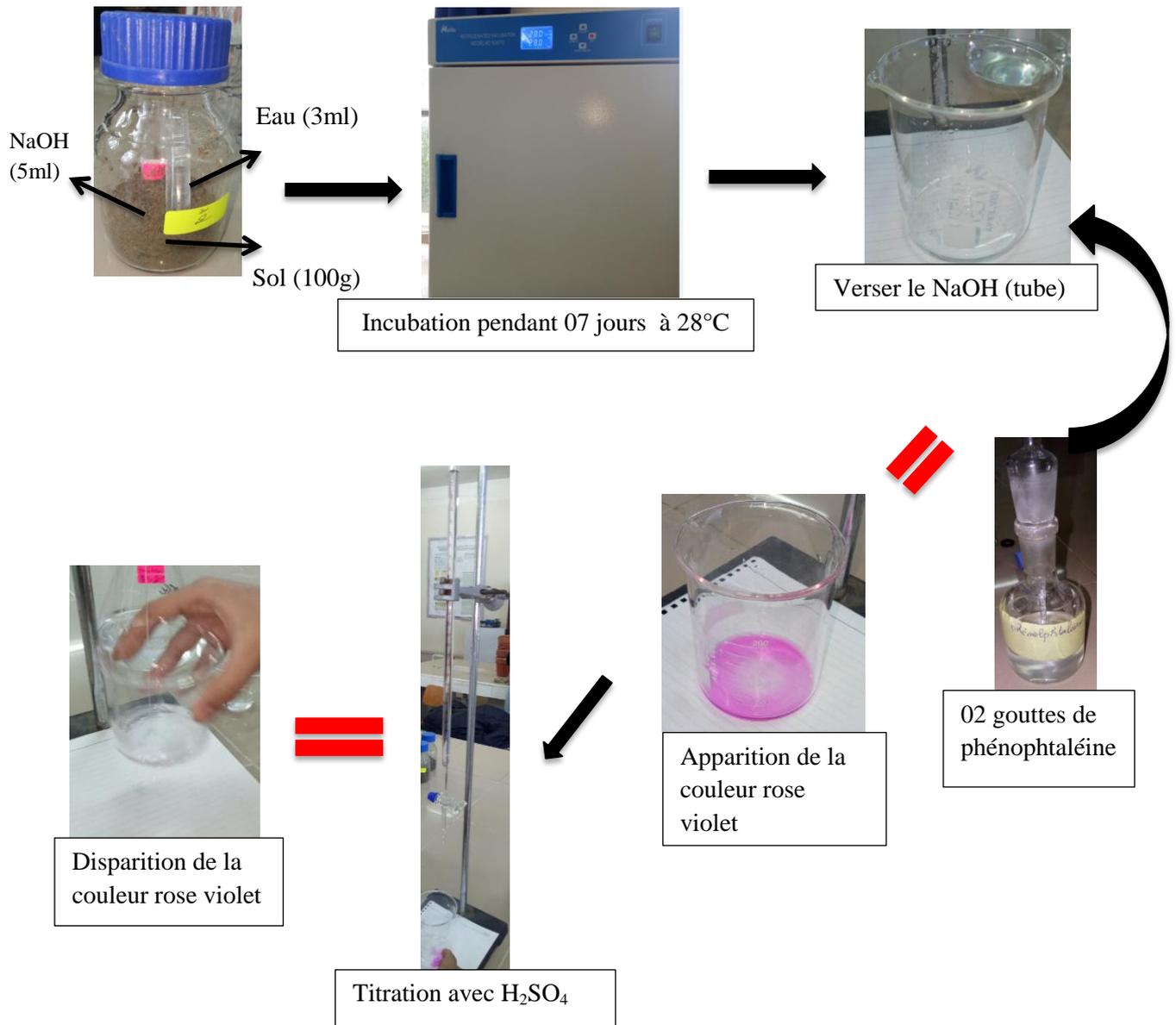
### **II.1. Les indicateurs biologique de la qualité du sol:**

#### **II.1.1. Respiration microbienne :**

L'activité biologique globale des sols a été évaluée par la méthode respirométrique, décrite par Dommergues (1968).

Il s'agit d'un dispositif d'incubation aérobie pendant 7 jours à une température constante (28°C), permettant de mesurer la quantité de CO<sub>2</sub> dégagée qui est capté par une solution de NaOH.

Dans des flacons de 250 ml contenant des échantillons de sol (100g) ont été placés deux tubes à hémolyse, l'un contenant 5ml de NaOH à 0,5 N et l'autre de l'eau pour éviter le dessèchement du sol. Trois répétitions ont été réalisées. Après incubation, la soude contenue dans les tubes est titrée par l'acide sulfurique à 0.25N tout en ajoutant 1 à 2 gouttes de phénophtaléine. La disparition de la couleur rose violacée marque la fin de la titration (fig. 2).



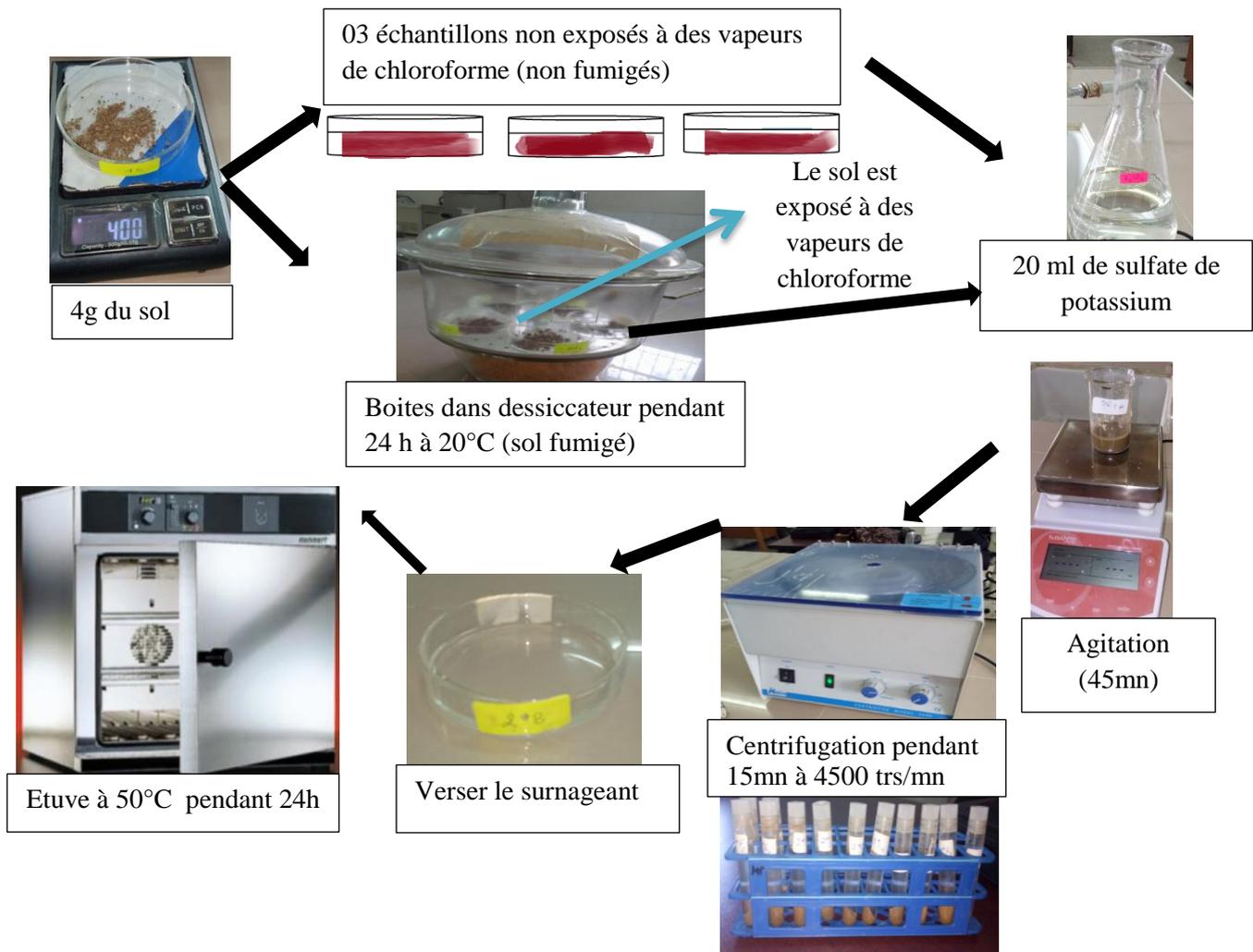
**Fig. 2:** Protocole de mesure de la respiration microbienne du sol (Originale, 2018)

Le taux de minéralisation du carbone est ensuite calculé en divisant la quantité de carbone du CO<sub>2</sub> sur la quantité de carbone organique, après avoir mesuré le carbone organique total dans les deux sols par la méthode Anne (1945) (page 21) avec une prise d'essai de 1g.

### II.1.2. Détermination de la biomasse microbienne :

La biomasse microbienne totale des sols a été mesurée selon la méthode proposée par Jenkinson et Powlson (1976) et adaptée par Chaussod et Nicolardot (1982). Il s'agit de déterminer la biomasse microbienne par la technique de fumigation-extraction. La biomasse microbienne fait référence à la fraction vivante de la matière organique.

Après avoir pesé 4g de chaque sol et les avoir placés dans des boîtes de Pétri, les échantillons de sol sont exposés à des vapeurs de chloroforme dans un dessiccateur pendant 24 heures à 20°C, ils sont donc fumigés. D'autres échantillons n'ont pas été exposés au chloroforme. Le sol de chaque boîte est ensuite mélangé avec 20ml de sulfate de potassium à 0.05N (rapport sol/solution de 1/5), agité pendant 45mn puis centrifugé pendant 15mn à 4500 trs/mn afin de récupérer le surnageant contenant le carbone extractible (fig. 3).



**Fig. 3:** Protocole de la fumigation-extraction (Originale, 2018)

Après séchage, le carbone organique est dosé par la méthode Anne (1945).

Le principe de cette manipulation repose sur l'oxydation du carbone organique en CO<sub>2</sub> par un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique à chaud, l'excès de bichromate de potassium est titré à froid avec le sel de Mohr en présence de quelques gouttes de diphénylamine et une pincée de NaF.

Au cours de la titration, la couleur de la solution passe du brun, au noirâtre, puis au violet et enfin au vert (fig. 4).

- Détermination du carbone de la biomasse microbienne :

La quantité de carbone soluble dans l'extrait du sol fumigé et non fumigé est utilisée selon l'équation suivante :

$$B_c = (CF - CNF) / K_{ec}$$

B<sub>c</sub> : Carbone de la biomasse microbienne ;

CF : Carbone du filtrat K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> du sol fumigé ;

CNF : Carbone du filtrat K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> du sol non fumigé ;

K<sub>ec</sub> : Coefficient d'efficacité d'extraction du carbone de la biomasse microbienne (K<sub>ec</sub>=0,38).

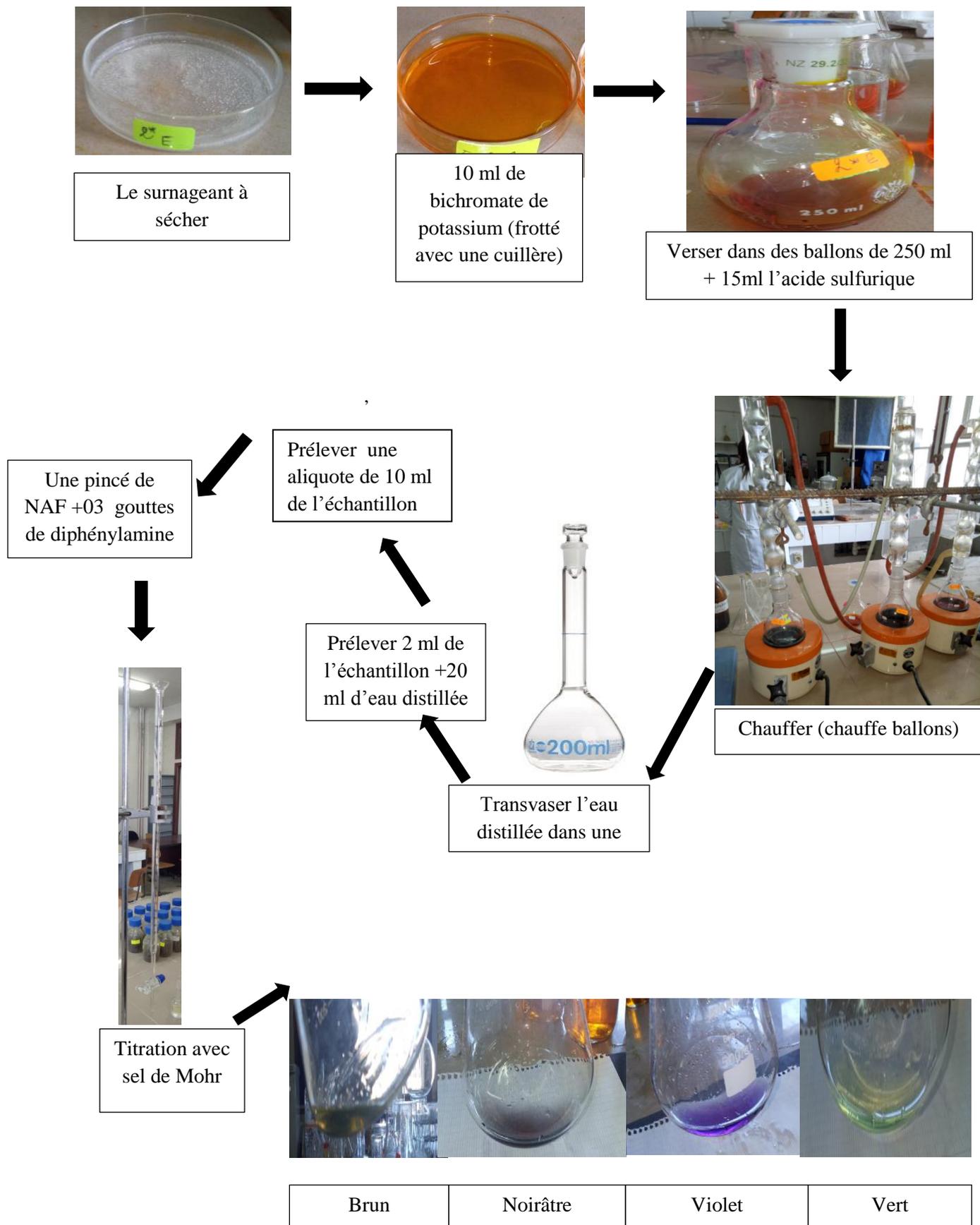


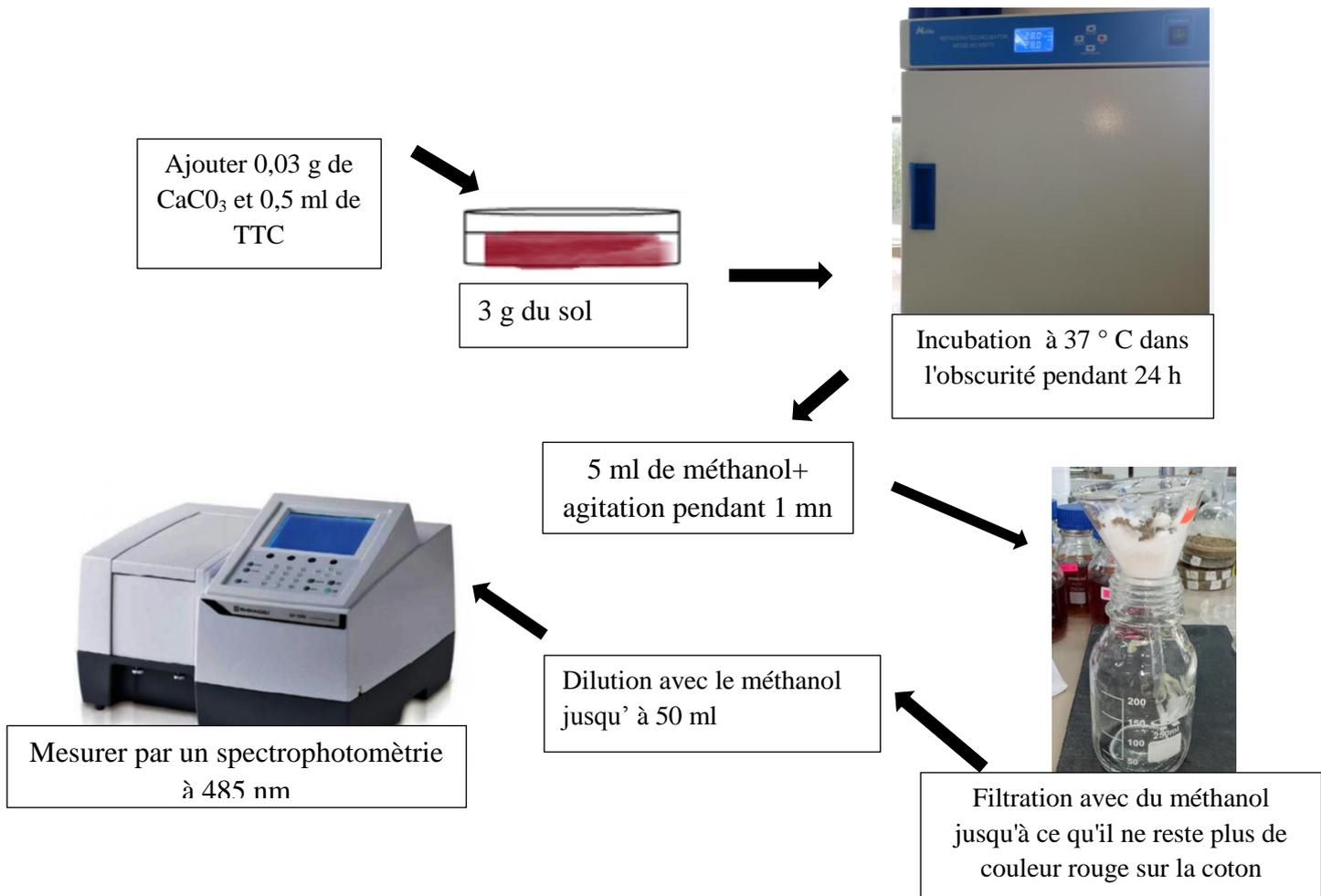
Fig. 4 : Protocole de dosage du carbone (Originale, 2018)

**II.1.3. Activité enzymatique :**

Ces activités ont été déterminées selon la méthode de Guan (1986).

**II.1.3.1. L'activité de la déshydrogénase (DHO) :**

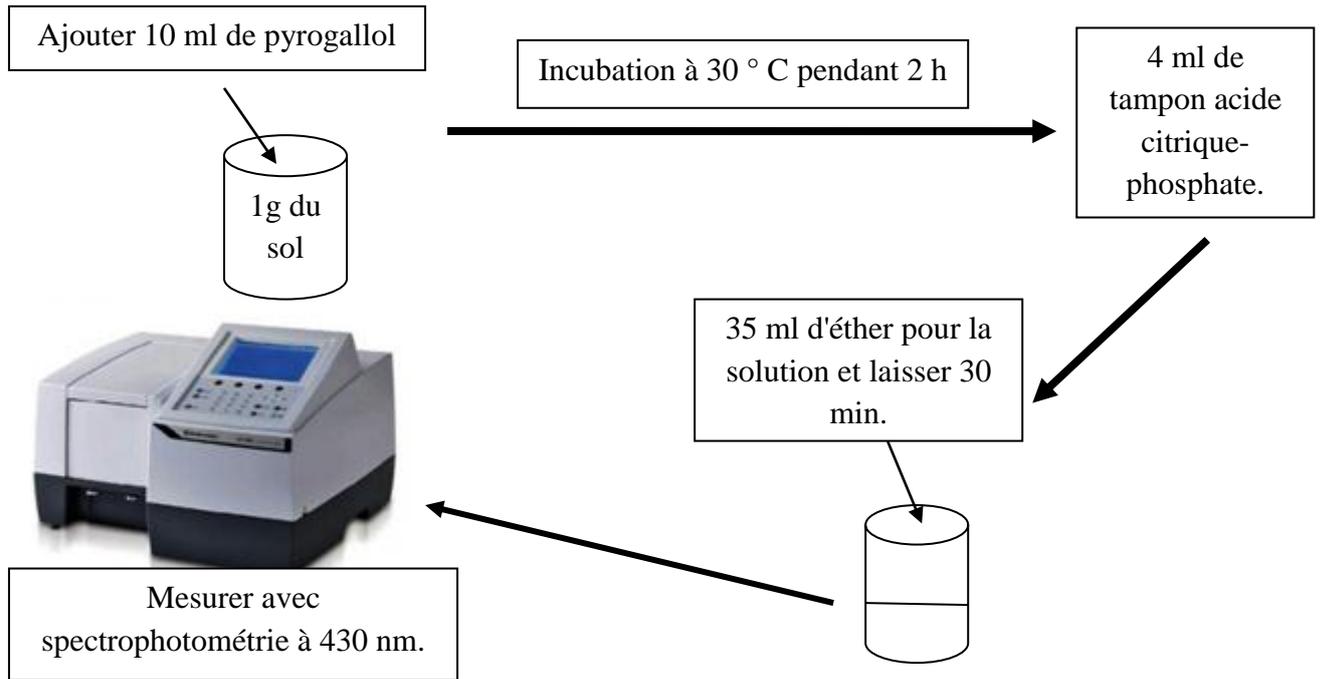
L'activité déshydrogénase a été déterminée en réduisant le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) en triphénylformazan (TPF). Une portion de 3 g de l'échantillon de chaque sol a été mélangée avec 0,03 g de  $\text{CaCO}_3$  et 0,5 ml de TTC à 3% et le mélange a été incubé à 37 °C dans l'obscurité pendant 24 h, ajouter 5 ml de méthanol et mélangé avec un agitateur pendant 1mn. Ensuite, la solution a été filtrée en un flacon volumétrique de 50 ml en utilisant des entonnoirs en verre, qui ont été bouchés avec du coton absorbant au fond des entonnoirs. Les sols dans les tubes ont été lavés dans les entonnoirs en utilisant du méthanol jusqu'à ce qu'il ne reste plus de couleur rouge sur le coton. Les échantillons ont ensuite été mesurés par un spectrophotomètre Shimazu UV-1280, à 485 nm après avoir été dilués à 50 ml en utilisant du méthanol. Un témoin sans  $\text{CaCO}_3$  et sans TTC a été effectué en parallèle (fig. 5).



**Fig. 5:** Protocole de dosage de la DHO (Originale, 2018)

**II.1.3.2. L'activité de la polyphénoloxydase (PPO) :**

Ajouter 10 ml de pyrogallol à 1% à un échantillon de sol (1 g) et le mélange réactionnel a été incubé à 30 °C pendant 2 h. Après l'incubation, 4 ml de tampon acide citrique-phosphate (pH 4,5) ont été ajoutés à la solution pour arrêter la réaction, suivi de l'addition de 35 ml d'éther. Le mélange a été extrait après 30 mn. L'éther coloré avec l'amorce gallique pourpre dissoute a été mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 430 nm. Un témoin sans sol et sans pyrogallol a été effectué (fig. 6).

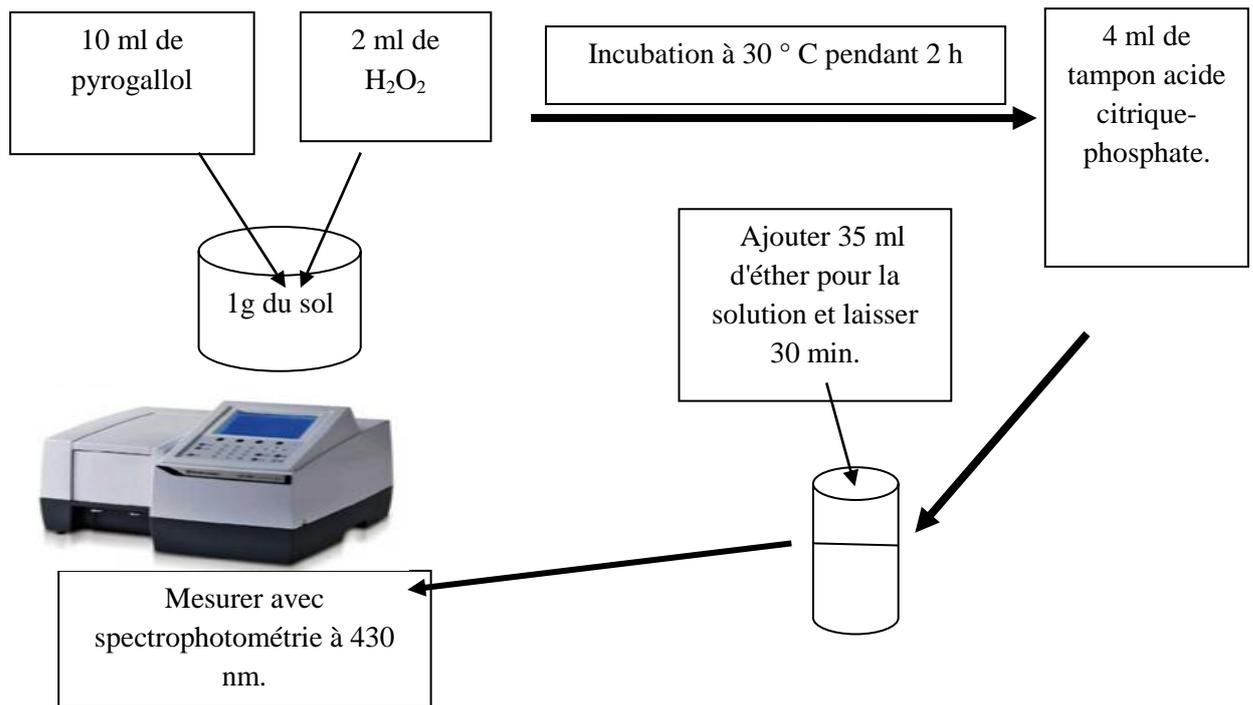


**Fig.6 :** Protocole de dosage de la PPO (Originale, 2018)

**II.1.3.3 L'activité de la peroxydase (POD) :**

Peser 1 g de sol dans un bécher, puis ajouter 10 ml de pyrogallol à 1% et 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,5%. Le mélange réactionnel a été incubé à 30 °C pendant 2 h.

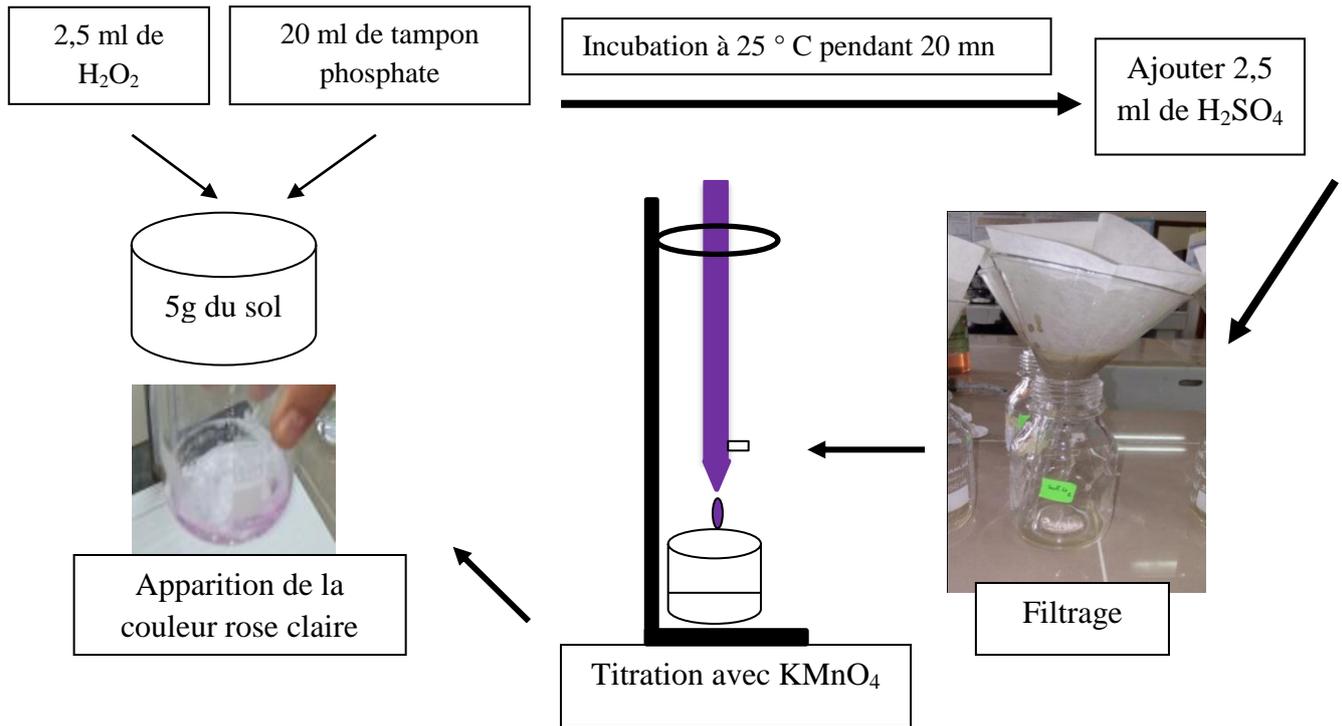
Après l'incubation, ajouter 4 ml de tampon acide citrique-phosphate (pH 4,5) à la solution pour arrêter la réaction, suivi de l'addition de 35 ml d'éther. Le mélange a été extrait après 30 minutes. L'éther coloré avec l'amorce gallique violette dissoute a été mesuré par spectrophotométrie à 430 nm. Des dosages sans sol et sans pyrogallol a été effectué en même temps (fig. 7).



**Fig. 7:** Protocole de dosage de la POD (Originale, 2018)

#### II.1.3.4. L'activité de la catalase (CAT) :

Ajouter 2,5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,3% et 20 ml de tampon phosphate (pH 7,0) à un échantillon de sol (5 g), et le mélange réactionnel a été incubé à 25 ° C pendant 20 min. 2,5 ml de 3,0 mol • L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ont été ajoutés à la solution pour arrêter la réaction, suivi du filtrage du mélange en le faisant passer à travers un papier filtre 15 ml du filtrat ont été titrés par 0,02 mol • L<sup>-1</sup> de solution de KMnO<sub>4</sub>. Enfin, le volume dissipatif de la solution de KMnO<sub>4</sub> jusqu'à le virement de couleur rose claire tout en tenant compte qu'il faut bien mélanger a été utilisé pour désigner l'activité CAT .Toutes les activités enzymatiques ont été mesurées en double pour le sol contaminé ainsi que le sol non contaminé (fig. 8).

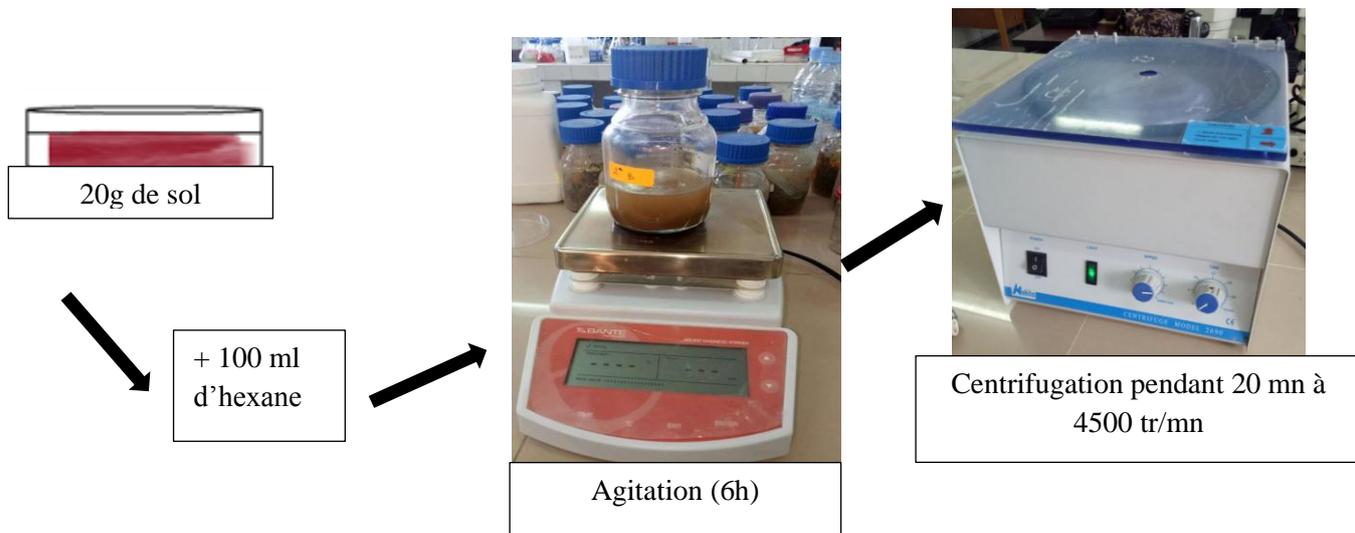


**Fig.8** : Protocole de dosage de la CAT (Originale, 2018)

## II.2. Analyse des hydrocarbures :

### II.2.1. Evaluation de la quantité des hydrocarbures totaux :

La mise en contact sol - solvant est favorisée par agitation mécanique de la solution. 100 ml d'hexane ont été ajoutés à 20 g du sol. Après agitation pendant 6 heures, ces derniers ont été centrifugés pendant 20 mn à 4500 tr/mn afin de récupérer les surnageants qui sont laissés jusqu'à évaporation du solvant. La quantité des hydrocarbures existants dans le sol est obtenue par pesée (fig. 9).



**Fig. 9** : Protocole de l'extraction des hydrocarbures résiduels (Originale, 2018)

### II.2.2. Analyse qualitative des hydrocarbures :

Après extraction des hydrocarbures selon le protocole décrit précédemment, la composition des hydrocarbures a été déterminée par spectroscopie UV (Shimazu–UV-visible -1280).

### II.3. Tests écotoxicologiques :

#### II.3.1. Test de germination :

Un protocole visant à examiner l'effet de la contamination par les hydrocarbures sur la germination des graines a été réalisé sur deux espèces végétales : le maïs et la laitue.

Après avoir pesé les graines de chaque végétal, celles ayant le même poids le maïs ( $0.215 \pm 0.005\text{g}$ ) et la laitue (entre 0.0010 et 0.0011g) ont été utilisées dans le test de germination. Ce test a été réalisé en semant 20 graines de chaque espèce dans des boîtes de Pétri contenant chacune 100g de sol. Les graines ont été recouvertes avec du sable de 1mm de diamètre, lavé séché et tamisé au préalable.

Les boîtes sont mises dans un incubateur à 20°C pendant 7 jours ; à l'obscurité les 4 premiers jours puis exposées à une photopériode de les trois jours restants. Tous ces échantillons ont été arrosés régulièrement.

Les graines germées ont été dénombrées et le taux de germination est calculé comme suit :

$$\text{Taux de germination (\%)} = \frac{\text{nombre de graines germées}}{\text{nombre total des graines}} \times 100$$

#### II.3.2 Elongation racinaire :

Il s'agit de mesurer à l'aide d'une règle graduée la longueur de la racine principale de chaque plante.

Après le dénombrement des graines qui ont germé, nous avons choisi les plantules présentant les racines les plus longues dont nous avons mesuré la longueur. Ces plantules ont été ensuite replantées dans leurs sols tout en tenant compte de leur emplacement puis remises dans l'incubateur à 20°C. Après 7 jours, nous avons procédé à la deuxième mesure de la longueur des mêmes racines.

L'élongation racinaire, qui indique la croissance de la racine, a été calculée comme suit :

$$\text{Longueur racinaire (cm)} = 2^{\text{ème}} \text{ mesure} - 1^{\text{er}} \text{ mesure}$$

### **III. Analyse statistique :**

L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée avec le logiciel R 3.0.2, la différence entre le sol contaminé et le sol non contaminé est considérée significative pour  $p\text{-value} < 0.05$ .

Les résultats de l'effet des hydrocarbures sur les propriétés biologiques du sol ont été soumis au test de Student pour deux échantillons indépendants ou à son équivalent non paramétrique ; test de Mann-Whitney, lorsque les données ne sont pas gaussiennes.

# **Chapitre III :**

## **Résultats et**

### **discussion**

## Chapitre III : Résultats et discussion :

### I. Résultats :

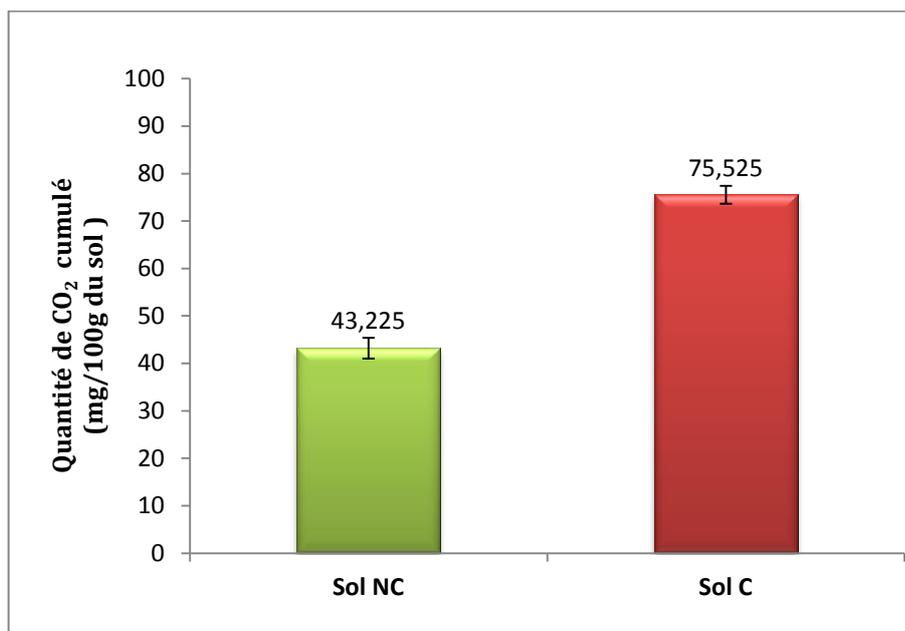
L'objectif de notre travail est de comparer la qualité biologique du sol contaminé par les HC à celle d'un sol non contaminé.

#### I.1. Effets des hydrocarbures sur les paramètres biologiques du sol :

##### I.1.1. Résultats du test respirométrique:

La production de CO<sub>2</sub> est un élément qui définit l'activité biologique globale d'un sol, L'effet de la contamination par les HC sur cette activité est illustré par la figure 10.

Les résultats montrent que le dégagement de CO<sub>2</sub> cumulé atteint une moyenne de 75,525 mg/100g de sol contaminé et 43,225 mg/100g de sol non contaminé respectivement ; ce qui représente une activité 1,75 fois plus importante en présence des carburants.



**Fig.10** : Dégagement de CO<sub>2</sub> cumulé en 7 jours dans le sol contaminé (C) et le sol non contaminé.

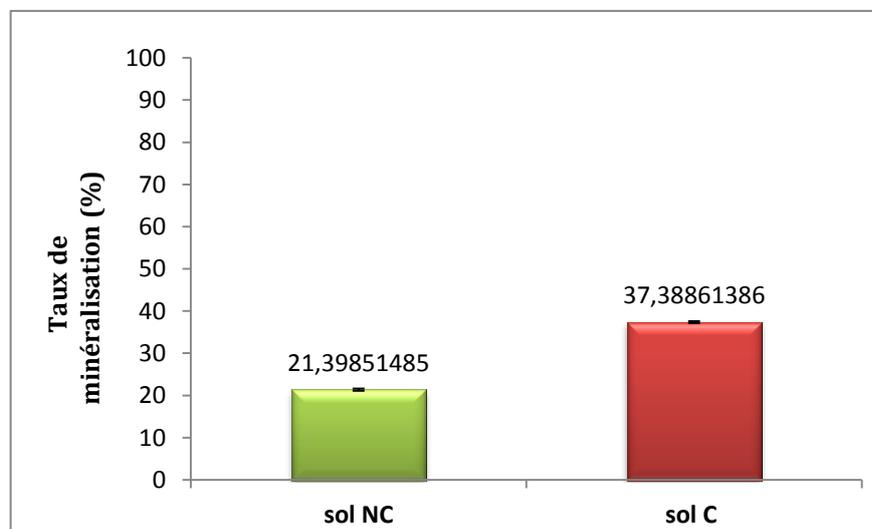
Le test de Student pour la respiration microbienne (Annexe II) a révélé qu'il y avait une différence très hautement significative entre les deux sols ( $P=0,0006938$ ), cela signifie que les HC ont eu un effet positif très hautement significatif sur l'activité biologique globale du sol.

### I.1.2. Taux de minéralisation :

Le taux de minéralisation du carbone représente la proportion de carbone «actif» pour 100 g sur le taux de carbone total. En ce sens, ce rapport représente «l'activité» de la MO du sol. La minéralisation est une série de réactions chimiques qui aboutit à la transformation des composés organiques en composés minéraux simples.

Les résultats de notre étude représentés dans la figure 11 montrent que le taux de minéralisation atteint une moyenne de 37,38861386 % dans le sol contaminé et une moyenne de 21,39851485 % dans le sol non contaminé.

D'après les résultats, une nette augmentation a été observée dans le sol contaminé par rapport à celui non contaminé.



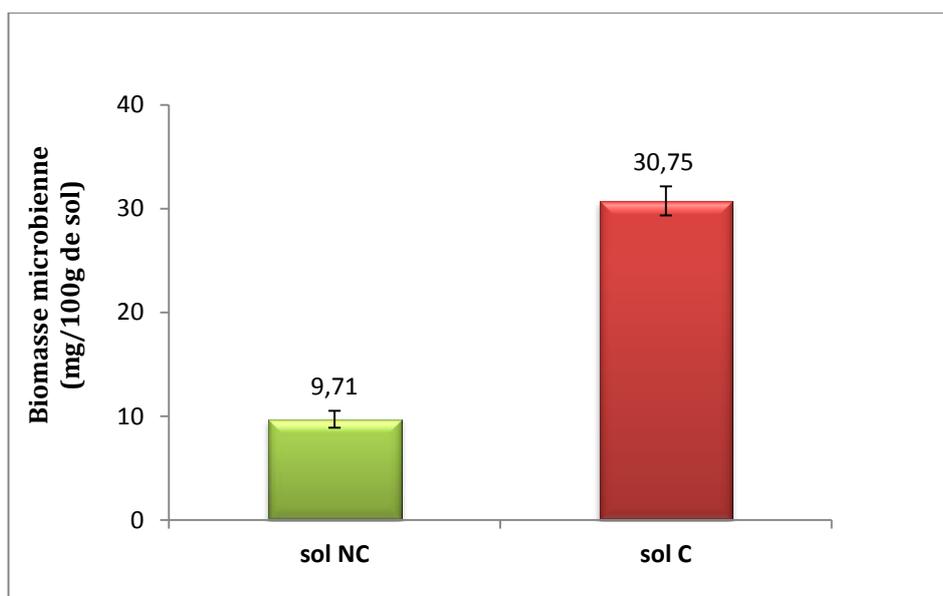
**Fig.11 :** Taux de minéralisation du carbone dans les sols contaminé et non contaminé.

Cette augmentation du taux de minéralisation dans le sol contaminé s'est révélée être très hautement significative ( $P=0,0006938$ ) par le test de Student (Annexe III). Cela indique que la contamination du sol par les carburants a agi positivement sur la minéralisation du carbone.

### I.1.3. Biomasse microbienne :

C'est un paramètre qui permet d'estimer la quantité de microorganismes présents dans le sol qui est fonction du carbone disponible afin de satisfaire les besoins énergétiques de ces microorganismes.

Les résultats de notre étude représentés dans la figure 12, montre que la biomasse a atteint au niveau du sol contaminé une moyenne de 30,75 mg /100g de sol contre une moyenne de 9,71 mg /100g de sol au niveau de celui non contaminé, soit une biomasse microbienne 3.16 fois plus élevée en présence des carburants.



**Fig. 12 :** Biomasse microbienne dans le sol contaminé et non contaminé.

Le test de Student (Annexe IV) a révélé qu'il y avait une différence hautement significative entre le sol contaminé et le sol non contaminé ( $P=0,00111$ ), cela indique que les carburants ont un effet positif sur la biomasse microbienne.

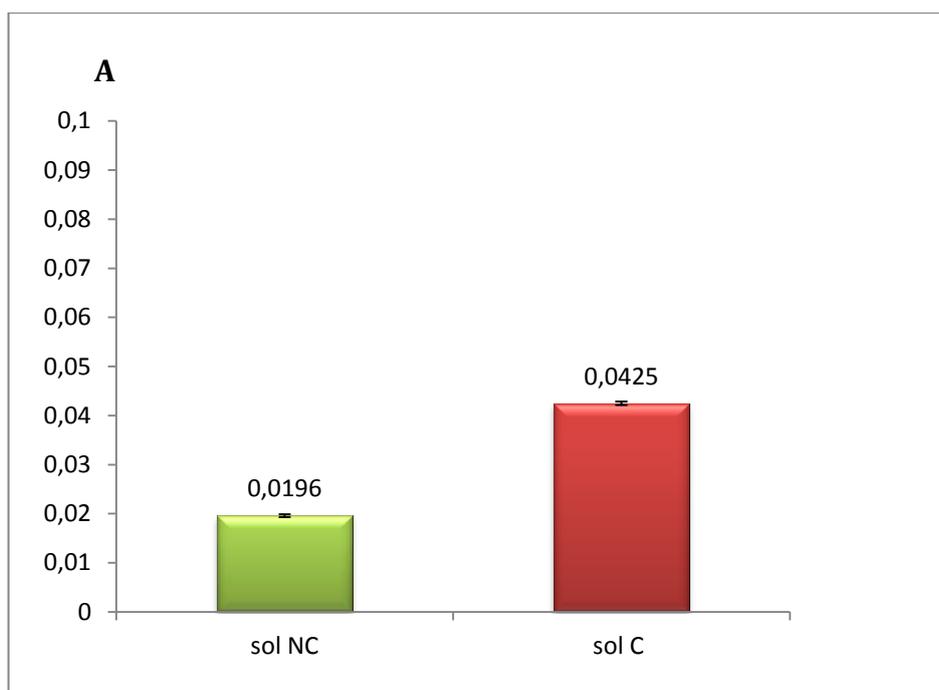
#### **I.1.4. Activité enzymatique :**

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques pour les réactions microbiennes dans le sol, elles sont étroitement associées à la MO et à la biomasse microbienne. Leurs activités présentent l'avantage d'évaluer plus rapidement comparativement aux autres paramètres du sol en cas de perturbation.

##### **I.1.4.1. Activité de la DHO :**

L'activité de la déshydrogénase est une mesure de la capacité d'oxydoréduction de la biomasse microbienne du sol. L'effet des hydrocarbures sur cette activité est illustré par La figure 13.

Les résultats montrent que le sol contaminé présente une activité 2.5 fois plus élevée dans le sol contaminé par rapport au non contaminé.



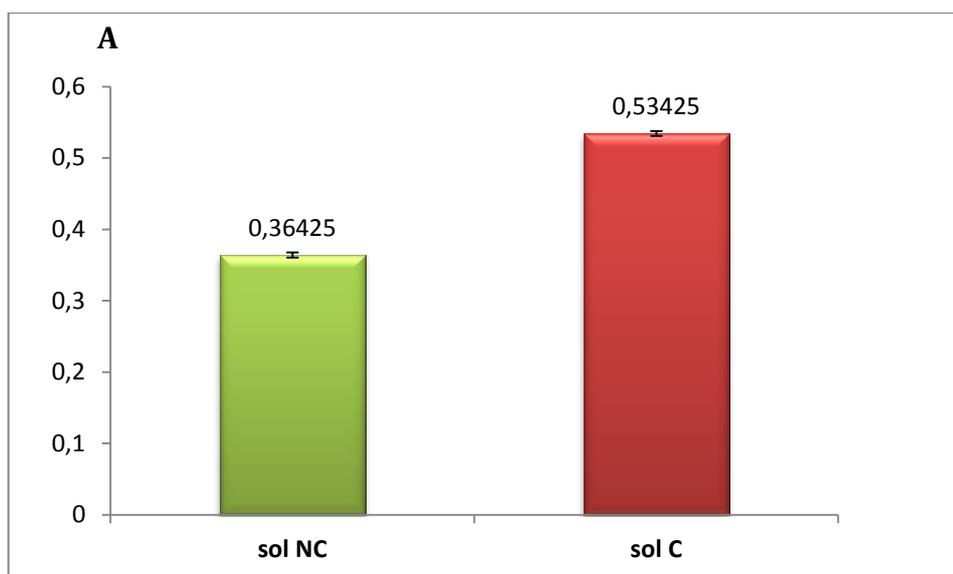
**Fig.13** : Activité de la DHO dans les sols contaminé et non contaminé.

Le test de Student pour la DHO (Annexe V) a fait ressortir que la différence était hautement significative entre le sol contaminé et le sol non contaminé ( $P=0,001023$ ), ce qui signifie que la contamination du sol par le mélange de l'essence super et du gasoil a provoqué l'augmentation de cette activité dans le sol.

#### **I.1.4.2. Activité de la PPO :**

La polyphénoloxydase intervient dans la conversion des composés organiques en fractions humiques. L'impact de la contamination par les carburants sur l'activité de la PPO est présenté dans la figure 14.

Les résultats de l'activité de la PPO montrent qu'elle est 1,5 fois plus importante dans le sol contaminé par rapport au sol non contaminé.



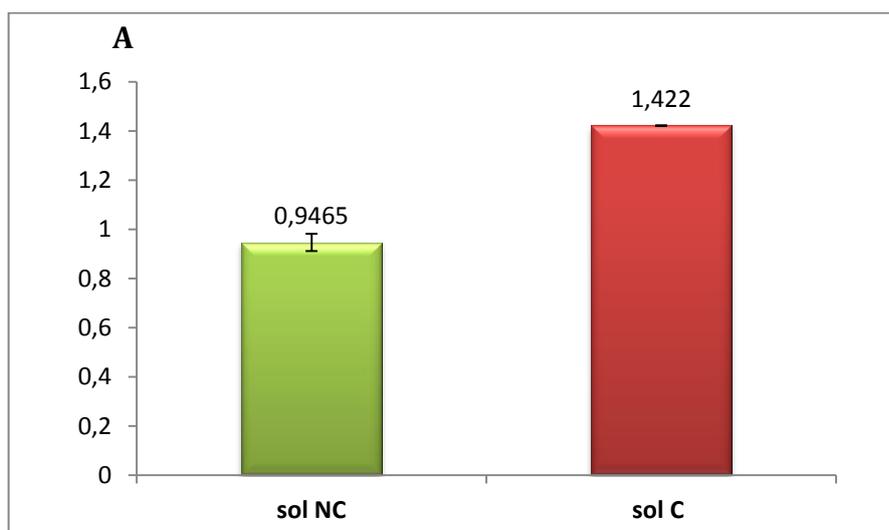
**Fig.14** : Activité de la PPO dans le sol contaminé et celui non contaminé.

Le test de Student (Annexe VI) a révélé que l'augmentation de l'activité de la PPO dans le sol contaminé par rapport au non contaminé était hautement significative ( $P=0,001726$ ), cela indique que les hydrocarbures présents dans ce sol ont eu un effet positif sur cette activité.

### I.1.4.3. Activité de la POD :

Les peroxydases sont capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques. L'impact des carburants sur cette activité est représenté par figure 15.

Les résultats montrent que cette activité a été 1,5 fois plus élevée dans le sol contaminé que dans le sol non contaminé.



**Fig.15** : Activité de la POD dans les sols contaminé et non contaminé.

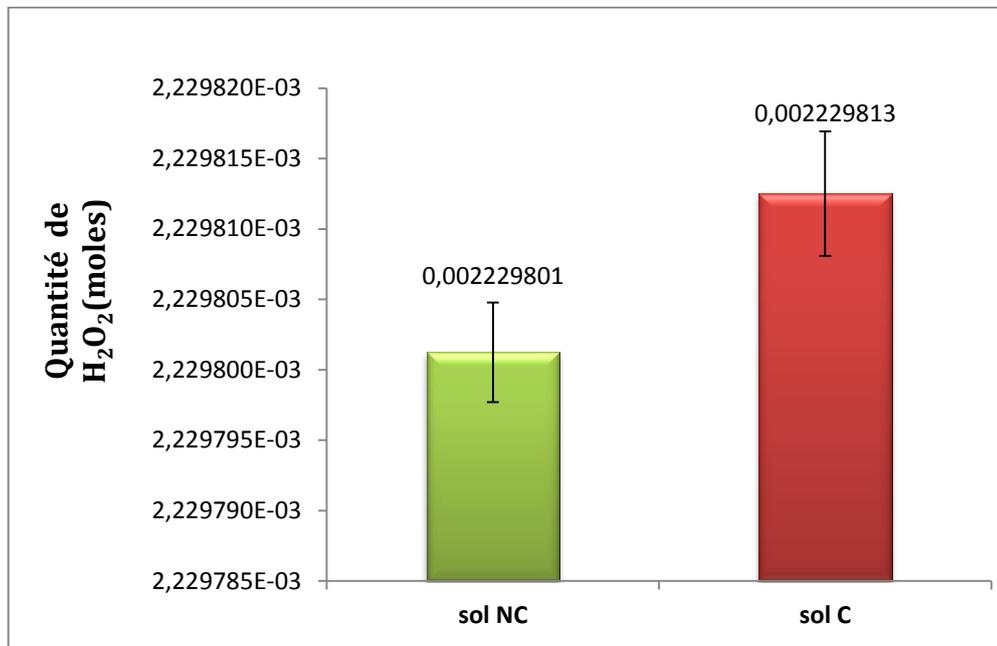
Le test de Student pour l'activité de la peroxydase (Annexe VII) montre qu'il y a une différence significative ( $P=0,0109$ ), cela indique que les carburants ont influencé positivement l'activité de cette enzyme.

### I.1.4.4. Activité de CAT :

La division du peroxyde d'hydrogène en molécules d'oxygène et d'eau peut être favorisée par la catalase. L'effet de la contamination par les HC sur cette activité est illustré par la figure 16.

Les résultats obtenus montrent que la quantité de  $H_2O_2$  transformée en  $O_2$  a atteint une moyenne de  $22,29813 \times 10^{-4}$  moles dans le sol contaminé et une moyenne de  $22,29801 \times 10^{-4}$  moles dans le sol non contaminé.

D'après ces résultats, nous constatons qu'il n'y a quasiment pas de différence de l'activité de CAT entre les deux sols.



**Fig.16 :** Activité de CAT dans le sol contaminé et le sol non contaminé.

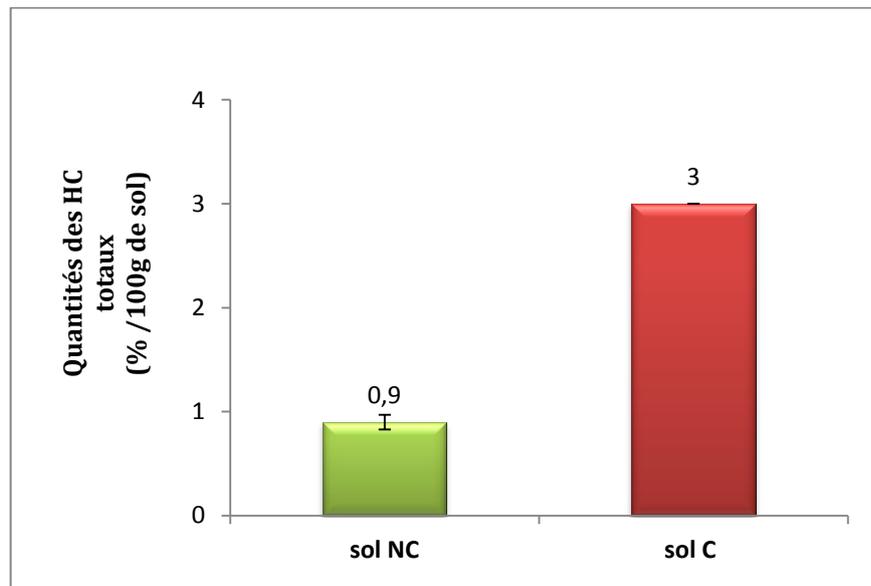
Le test de Student pour l'activité de la catalase (Annexe VIII) montre que la différence est non significative entre les deux sols ( $P=0,3034$ ), ce qui signifie que la contamination du sol par les carburants n'influe pas sur l'activité de cette enzyme.

### I.2. Analyse des hydrocarbures :

#### I.2.1. Evaluation de la quantité d'hydrocarbures totaux :

L'extraction des hydrocarbures totaux dans le sol est un critère quantitatif qui permet d'apprécier la quantité des hydrocarbures qui existent dans le sol. La figure 17 représente la quantité des hydrocarbures totaux présents dans les deux sols (C, NC).

Les résultats montrent, toute somme logique, que le sol contaminé contient une quantité plus élevée d'hydrocarbure (3%) par rapport au sol non contaminé (0,9 %).



**Fig.17:** Quantités des HC totaux dans les sols contaminé et non contaminé.

Le test de Student (Annexe IX) montre qu'il y a une différence hautement significative ( $P=0,00226$ ) entre la quantité d'hydrocarbures contenus dans le sol contaminé et celle contenue dans le sol non contaminé.

#### I.2.2 Analyse qualitative des hydrocarbures:

L'analyse qualitative des hydrocarbures par spectroscopie UV a permis d'identifier les hydrocarbures présents dans les deux sols.

Nous remarquons que les deux sols, contiennent des HAP (gasoil) et que leur présence est importante dans le sol pollué (Benzo[a]anthracène, Benzo[a]pyrène, Dibenzo[a,h]anthracène) avec des valeurs d'absorbance plus élevées par rapport au sol non contaminé qui présente un seul HAP (Benzo[a]anthracène) avec une faible absorbance (tableau IV).

**Tableau IV** : Résultats obtenus par la spectroscopie UV

Sol	Longueur d'onde (nm)	Absorbance	HAP	Nombre de cycles aromatiques
Sol C	286	2,467	Benzo[a]anthracène	4
	294	2,977	Dibenzo[a,h]anthracène	5
	296	2,630	Benzo[a]pyrène	5
Sol NC	286	0,614	Benzo[a]anthracène	4

### I.3.Effets des hydrocarbures sur le végétal :

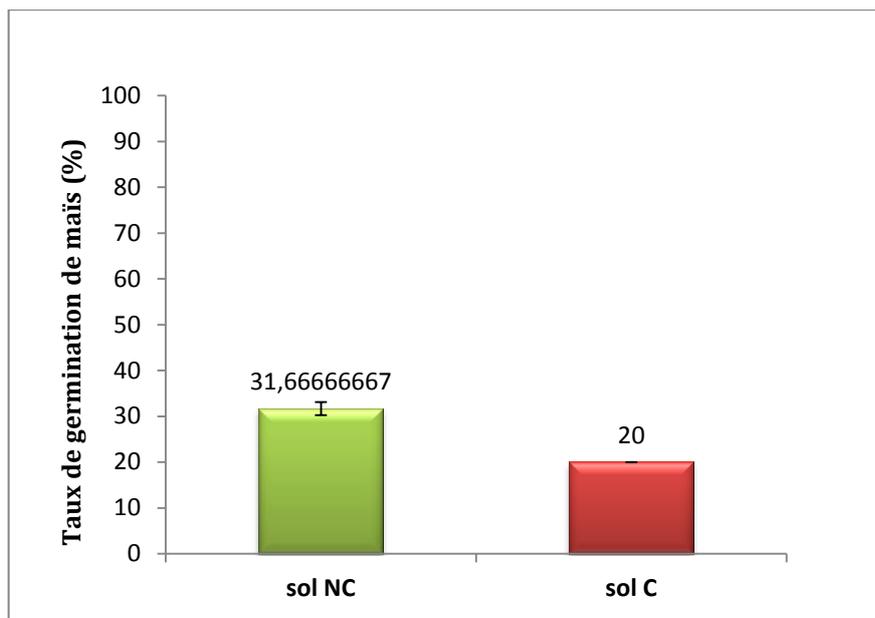
#### I.3.1. Taux de germination :

Pour l'évaluation de la phytotoxicité des carburants, nous avons calculé le taux de germination qui est un indicateur fiable de la qualité biologique du sol.

##### I.3.1.1. Maïs :

La figure 18 illustre le taux de germination des graines de maïs dans un sol non contaminé et contaminé par les carburants.

D'après cette figure, nous remarquons que le pourcentage de germination des graines de maïs enregistré dans le sol non contaminé était de 31,67 % tandis qu'il était de 20 % dans le sol contaminé, soit un taux d'inhibition de -37%.



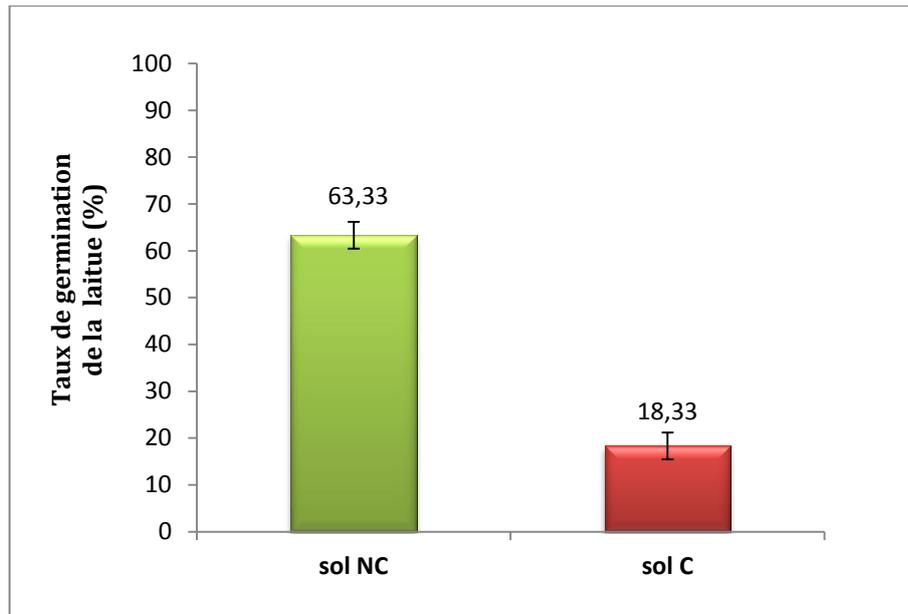
**Fig.18:** Taux de germination des grains de maïs dans le sol contaminé et non contaminé.

Le test de Student pour le taux de germination du maïs (Annexe X) a révélé qu'il y avait une différence significative entre le sol contaminé et le sol non contaminé ( $P= 0,0198$ ), cela indique que les carburants ont un effet inhibiteur significatif sur la germination des graines de maïs.

### **I.3.1.2. Laitue :**

La figure 19 illustre le taux de germination des graines de laitue dans un sol non contaminé et contaminé.

D'après les résultats, nous remarquons que le taux de germination est de 63,33 % dans le sol non contaminé et est de 18,33% seulement dans le sol contaminé, ce qui représente un taux d'inhibition de -71 %.



**Fig.19** : Le taux de germination des grains de laitue dans un sol contaminé et non contaminé.

Le test de Student pour le taux de germination de la laitue (Annexe XI) a révélé qu'il y avait une différence très hautement significative ( $P=0,0006726$ ), cela indique ainsi que les carburants ont influencé négativement la germination des graines de laitue.

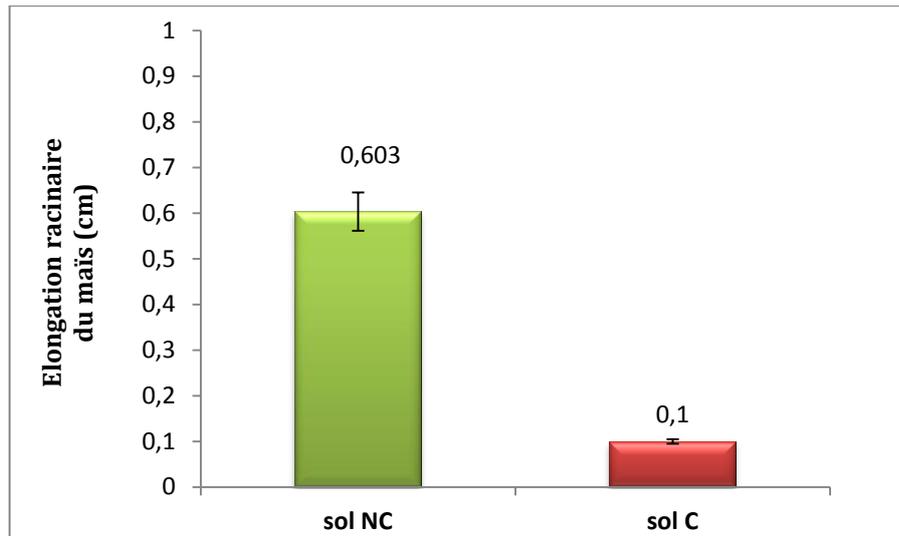
### I.3.2 Elongation racinaire :

Pour l'évaluation de la toxicité des HC vis-à-vis des espèces végétales (maïs, laitue), nous avons quantifié la croissance racinaire de ces deux espèces.

#### I.3.2.1.Maïs :

La figure 20 représente les résultats de l'élongation racinaire du maïs dans le sol contaminé et non contaminé.

Pendant une durée de 7 jours, l'élongation racinaire était 6 fois plus importante dans le sol non contaminé (0,603cm) que dans le sol contaminé (0,1 cm) de ce fait un taux d'inhibition est estimé par une valeur de -83 %



**Fig.20** : Elongation racinaire de maïs dans un sol contaminé et non contaminé.

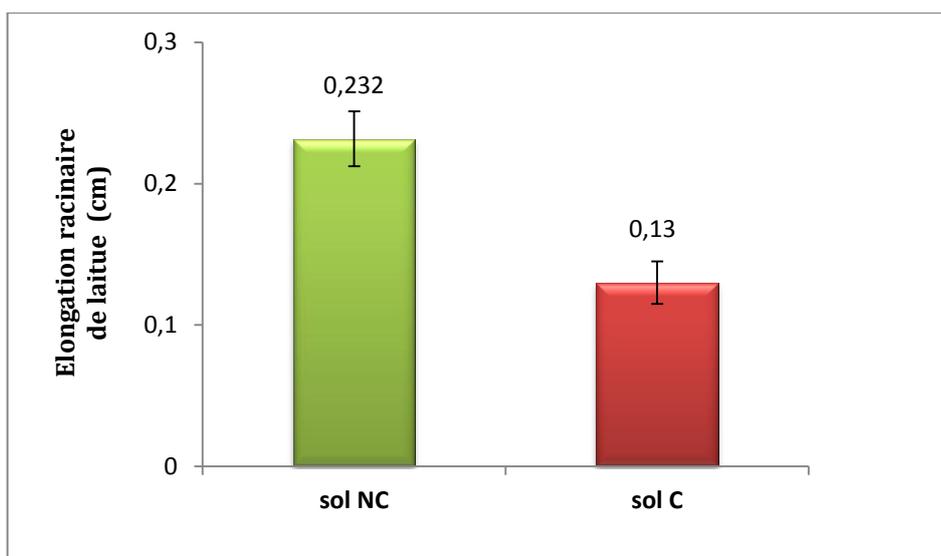
Le test de Student pour l'élongation racinaire du maïs (Annexe XII) a révélé une différence très hautement significative ( $P=0,000497$ ) entre le sol contaminé et le non contaminé, cela signifie que les HC ont un effet négatif sur la croissance des racines de cette espèce.

### **I.3.2.2 Laitue :**

La figure 21 représente l'élongation racinaire, pendant 7 jours, de la laitue dans le sol contaminé et non contaminé.

Les résultats montrent que, l'élongation racinaire dans le sol non contaminé a atteint une moyenne de 0,232 cm et une moyenne de 0,13 cm dans le sol non contaminé. Ce qui représente un taux d'inhibition de -43,96%

Nous constatons que l'élongation racinaire de laitue a diminué de près de la moitié dans le sol contaminé comparativement au sol non contaminé.



**Fig.21** : Elongation racinaire de laitue dans un sol contaminé et non contaminé.

Le test de Student pour l'élongation racinaire de la laitue (Annexe XIII) a révélé qu'il y avait une différence significative ( $P=0,02552$ ) entre les deux sols pollué et non pollué, cela indique que les carburants exercent un effet dépressif sur la croissance de ces racines.

### II. Discussion :

La qualité biologique du sol reflète l'état et la santé de ce compartiment. Un grand nombre de résultats sont disponibles dans la littérature sur l'utilisation des tests sur les microorganismes ainsi que les enzymes en tant que bioindicateurs de la présence des HC, diesel et métaux lourds. Ce sont des outils faciles et fiables pour détecter et mesurer la concentration des polluants avant, pendant et après le processus de restauration (Rao *et al.*, 2015).

D'après les résultats des tests sur le sol contaminé et celui non contaminé obtenus au cours de notre travail, nous avons observé des différences significatives concernant la respiration microbienne, le taux de minéralisation, la biomasse microbienne et l'activité enzymatique de la PPO et la DHO et la POD. Ceci signifie que les HC ont agi de la même façon sur les propriétés biologique du sol et donc une assez bonne relation existerait entre ces dernières,

L'augmentation de ces paramètres dans le sol contaminé peut être expliquée par l'adaptation des microorganismes à ces polluants.

Ces résultats peuvent être justifiés par le fait que les microorganismes qui étaient déjà présents quand la contamination s'était produite sont capables de croître et de se multiplier sur un tel sol.

Plusieurs études confirment qu'une contamination par le gasoil provoque une augmentation significative dans les paramètres biologiques du sol tels que la biomasse microbienne, la respiration microbienne ainsi que l'activité enzymatique grâce à la prolifération des microorganismes résistants (Margesin *et al.*, 2000 ; Tejada *et al.*, 2008 ).

Nos résultats concernant l'activité biologique du sol concordent avec ceux obtenus par Domergues et Mangenot (1970) et Chaineau *et al.* (1996), Duchaufour (2001). Ces auteurs ont trouvé une grande diversité de bactéries et de champignons qui peut s'adapter à de nouvelles conditions telle que la pollution par les HC car ceux-ci deviennent à leur tour une nouvelle source de carbone dans le sol. Ces microorganismes doivent développer un certain nombre d'adaptations pour pouvoir utiliser de tels substrats.

Nos résultats concernant la production de CO<sub>2</sub> et le taux de minéralisation du carbone peuvent être expliqués par la solubilité des HC qui est éventuellement le facteur clef influençant leur biodisponibilité, d'où une plus grande production de CO<sub>2</sub> dans le sol contaminé par rapport au sol non contaminé.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Maliszewska-Kordybachet Smreczak, (2003) qui ont constaté que la respiration microbienne est plutôt stimulée par la présence des carburants. Cette stimulation peut s'expliquer par la résistance de certains microorganismes, responsables de la dégradation des HC, ou bien à la minéralisation de cellules microbiennes n'ayant pas survécu à la contamination (Labud *et al.*, 2007).

Domergues et Mangenot (1970), Rivière et Gatellier (1976) et Rouquerol et ses collaborateurs (1987) affirment qu'un sol imprégné par les HC présente un très grand nombre de germes revivifiables, avec des coefficients de minéralisation élevés qui tendent à épuiser le sol des éléments nutritifs.

Selon les résultats de l'activité enzymatique (PPO, POD et DHO), nous supposons que la sécrétion des enzymes dans le sol pollué est probablement due au fait qu'elle soit étroitement associée à la biomasse microbienne : de ce fait l'augmentation de l'activité de ces microorganismes aboutit à l'augmentation de l'activité de ces enzymes en cas de stress.

Plusieurs auteurs affirment qu'une contamination du sol par les HC modifie généralement la succession des microorganismes, dont le nombre augmente grâce à la forte relation positive entre les bactéries hétérotrophes et les carburants qui sont aussi directement associées à l'activité des enzymes du sol. Les polluants peuvent avoir une action positive sur

l'activité microbienne en induisant une production plus élevée d'enzymes notamment la DHO (Dominguez et Pichtel, 2004 ; Wyszowska *et al.*, 2006).

Ces résultats concordent également avec ceux de Bergue (1986) et Pelmont (1993) *in* Ali Ahmed (2011), qui ont noté que l'apport des carburants dans le sol accroissait de façon considérable les activités bactériennes. Cette adaptation peut être expliquée par le fait que les bactéries font intervenir les enzymes caractérisées par une faible spécificité, ou par la synthèse de nouvelles enzymes spécifiques aux polluants présents dans le sol.

Pour leur part, Hüseyin (2015), Klamerus-Iwan *et al.* (2015) ont constaté que la possibilité pour un polluant d'entrer dans les voies métaboliques est très souvent due à la présence d'une enzyme spécifique qui effectue la première réaction chimique particulière, essentielle pour rendre le polluant susceptible de subir des transformations enzymatiques ultérieures.

De plus, nos résultats sur la POD concordent avec ceux obtenus par Tang *et al.* (2010) qui ont constaté que les champignons qui sécrètent la peroxydase sont les organismes les plus abondants dans un sol pollué par les carburants, ce qui montre comment rapidement les microorganismes indigènes du sol s'adaptent à de nouveaux substrats.

D'après les résultats obtenus, seule l'activité enzymatique de la catalase n'a pas été affectée par la présence des carburants. Cette enzyme ne semble pas être stimulée par la présence des carburants.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Mohsenzadeh *et al.* (2012) qui ont constaté une stabilité de l'activité de la catalase lors d'une contamination par le diesel. Ces auteurs ont lié ceci à la sensibilité des microorganismes ou indirectement à la détérioration des propriétés physiques du sol suite à une contamination pareille.

Par ailleurs, nous avons constaté, en plus de la quantité plus élevée d'hydrocarbures dans le sol contaminé, celui-ci contient 3 HAP par rapport au sol non pollué qui n'en contient qu'un seul. Nous supposons que l'absence des hydrocarbures aliphatiques (alcanes et alcènes) est peut être due à leur volatilisation car ils sont caractérisés par une forte pression de vapeur.

Concernant nos résultats sur la phytotoxicité des carburants, nous avons constaté une inhibition de la germination des graines et la croissance des racines. Cette baisse serait probablement due à la toxicité de ce dernier vis-à-vis de l'embryon. Elle peut être causée également par la diminution de la mouillabilité des graines à cause de la présence d'une substance huileuse (HC), surtout quand on sait que l'eau est le premier facteur limitant pour la germination.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Amadi *et al.* (1992) *in* Chaineau *et al.* (1996) et Koller (2004) qui notent que l'inhibition de la germination est corrélée

essentiellement avec l'hydrophobie des hydrocarbures qui peuvent entrer dans les graines, empêcher et/ ou réduire les réactions métaboliques de l'embryon ainsi que les échanges d'eau et de gaz; pouvant entraîner la mort de l'embryon.

Adam et Duncan (2002) notent que le diesel crée un film huileux imperméable autour des graines ou des racines qui peuvent agir comme une barrière physique, réduisant à la fois le transfert de l'eau et de l'oxygène assimilés par les graines ce qui va automatiquement engendrer un manque d'O<sub>2</sub> dont les racines ont besoin. Ceci peut être également dû aux changements dans les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol. Nos résultats à propos de l'élongation racinaire du maïs et de la laitue pourraient être expliqués par le fait que les racines soient soumises directement aux polluants (contact direct). Cette hypothèse est étayée par les résultats d'Adam et Duncan (2002), et Parus *et al.* (2017) qui rapportent que lors d'un déversement de carburants dans le sol et en particulier le gasoil, ces derniers ne migrent pas à travers les profils du sol en raison de leurs propriétés hydrophobes mais ils seront maintenus à la surface du sol et dans la zone d'enracinement de la plupart des espèces végétales. Ils peuvent conduire alors, à des difficultés pour les racines à absorber l'eau et les nutriments de manière habituelle ou bien aux contraintes physiques induites par le carburant empêchant ou réduisant le transfert d'eau et d'oxygène à la graine par conséquent, l'oxygène ne serait pas capable de diffuser aux racines des plantes cela conduit à des changements dans le potentiel redox de la zone racinaire.

Aussi, l'analyse qualitative des hydrocarbures présents dans les deux sols laisse penser que les deux espèces sont sensibles aux HAP identifiés dans le sol pollué (Benzo[a]pyrène et Dibenzo[a,h]anthracène).

Enfin, selon Bergue (1986) ainsi qu'Ogbo *et al.* (2009), la phytotoxicité des hydrocarbures dépend de l'espèce végétale et du stade physiologique de la végétation. En effet, l'inhibition de la germination et de l'élongation racinaire était plus marquée chez la laitue par rapport au maïs. Ceci rejoint le résultat de Chaineau *et al.* (1997) qui ont observé une plus grande sensibilité de la laitue aux hydrocarbures par rapport au maïs.

# **Conclusion et perspectives**

### Conclusion et perspectives :

Le présent travail a consisté en un essai d'évaluation et de quantification de l'effet de la contamination aux carburants d'un sol d'une station-service, par le biais d'indicateurs biologiques (biomasse et respiration microbiennes, activité enzymatique et fertilité). Une analyse quantitative et qualitative des hydrocarbures du sol a également été effectuée.

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que l'action des carburants se traduit par une modification remarquable de la qualité biologique du sol.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les effets d'un déversement de carburants sur les propriétés biologiques, qui se traduisent par :

- une action positive sur la biomasse des microorganismes et sur leur respiration, ce qui signifie que les populations indigènes sont aptes à se multiplier en cas de pollution d'où un dégagement plus important de CO<sub>2</sub> accompagné d'un taux de minéralisation plus élevé dans le sol contaminé, car les carburants peuvent être utilisés comme source d'énergie ;

- une augmentation de l'activité enzymatique (POD, DHO, PPO) dans le sol pollué a été observée par rapport au non contaminé tandis qu'aucun effet significatif n'a été observé sur l'activité de la catalase ;

- un effet dépressif vis-à-vis de la germination des graines de maïs et de laitue ainsi sur l'élongation racinaire des plantules des deux espèces. La laitue s'est avérée plus sensible aux carburants que le maïs avec des taux d'inhibition plus importants.

L'analyse des hydrocarbures a permis de mettre en évidence la présence de trois HAP persistants dans les sols qui sont le benzo[a]pyrène, le benzo[a]anthracène et le dibenzo[a,h]anthracène qui seraient contenus dans le gasoil étant donné que l'essence est constituée essentiellement d'aliphatiques. C'est cette fraction aromatique qui aurait été à l'origine des observations enregistrées sur les paramètres biologiques étudiés.

Nous concluons également que l'activité enzymatique du sol s'avère être un paramètre très utile pour l'évaluation des effets des HC sur le sol. Ce sont des indicateurs pertinents de la pollution des sols aux hydrocarbures.

Il serait intéressant, dans les études futures, d'étudier les corrélations entre les paramètres physico-chimiques et biologiques afin de mieux comprendre les modifications de ces derniers suite à une contamination aux carburants.

Il conviendrait d'étudier aussi la cinétique de l'activité enzymatique dans le temps pour comprendre leur mode d'action dans la transformation des hydrocarbures dans les sols.

Enfin, étant donné que les enzymes du sol sont sécrétées par les plantes et les organismes vivants du sol, nous préconisons de mettre en évidence le rôle des exsudats racinaires ou encore des micro-organismes de la rhizosphère dans la synthèse des enzymes capable de dégrader les hydrocarbures afin de stimuler ce processus.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques :

1. Adam G., Duncan H., 2002: Influence of Diesel Fuel on Seed Germination. *Enviro, Pollut.* Vol. 120. pp: 363-370.
2. Agele S.O., Adeyemo A.J., Bamiduro I., 2017: Dynamics of Chemical and Biological Properties of Organically Amended Petroleum Hydrocarbon Polluted Soil as Affected by Incubation Periods. *J Bioremediat Biodegrad.* Vol. 8. N°2. pp: 389-405.
3. Ali Ahmed S., 2010: Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures à l'aide de tensioactifs obtenus par voie biologique. Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques INA d'Alger.45P.
4. Alrumman S.A., Standing D.B., Paton G.I., 2015: Effect of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University—Science.* Vol. 27. pp: 31-41.
5. Amireche L., 2014: Etude de la pédofaune selon un gradient de pollution par les hydrocarbures. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 33p.
6. Amiri N., 2013: Effets des hydrocarbures sur quelques propriétés des sols et essai de décontamination biologique. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O.45p.
7. Ammar O., Nafil K., 2014: Effet des carburants (essence normale, essence super et gasoil) sur la croissance de la fève (*Vicia faba* L.) et sur la production des polyphénols. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 30p.
8. Andreoni V., Cavalca L., Rao M.A., Nocerino G., Barnasconi S., Dell'Amico E., Colombo M., Gianfreda L., 2004: Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere.* Vol. 57. pp: 401-412.
9. Anne P., 1945: Analyses des matières organiques dans le sol. Services scientifiques centraux. Bondy Laboratoire de Chimie des sols et Pédologie Appliquées. pp: 70-74.
10. Bachelier G., 1978: La faune du sol son écologie et son action .Ed.O.R.S.T.O.M. 335p.
11. Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., Soulas G., 1996: Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Etude et gestion des sols.* Vol. 3. N° 4. pp: 279-296.
12. Bastida F., Zsomnay A., Hernandez T., Garcia C., 2008: Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma.* Vol. 147 .N°3. pp: 159-171.
13. Belhocine H., 2016: Etude de l'efficacité d'une plante ornementale (*Chlorophytum Comosum*) dans la décontamination d'un sol pollué aux hydrocarbures. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 30p.

14. Bergue J.M., Mérienne D., 1986: La pollution des sols par les hydrocarbures. Bull,liaison Labo P. et Ch. Vol. 146. pp: 57 – 66.
15. Bocard C., 2006: Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures. Enjeux Environnementaux et traitement des pollutions. Edition Technip. Paris. 297p.
16. BOFAS, Directive BOFAS., 2004: Assainissement des sols des stations-service en Belgique. 153p.
17. Bourkache R., Boussenou N., 2015: Essai de phytoremédiation in-situ et ex-situ d'un sol pollué par les hydrocarbures. Cas des stations-service. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 38p.
18. Cabana H., Jiwan J.L., Rozenberg R., Elisashvili V., Penninckx M., Agathos S.N., Jones J.P., 2007: Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere*.Vol. 67. pp: 770–778.
19. Carnicer P., 2007: La pollution ponctuelle des sols: Le cas des stations-service dans la Région de Bruxelles-Capitale. Mémoire. Diplôme d'Études Spécialisées en Gestion de l'Environnement. Université Libre de Bruxelles. 154 p.
20. Casañola-Martín GM., Khan M.T.H., Marrero-Ponce Y., Ather A., Sultankhodzhaev M.N., Torrens F., 2006: New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.Vol. 16. pp: 324-330.
21. Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J., 1996: Land treatment of oil based drill Cuttings in an agricultural soil. *Journal of Environmental Quality*.Vol. 25. N° 4. pp: 858-867.
22. Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J., 1997: Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Quali*.Vol. 26. pp: 1478-1483.
23. Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J., 2000: Biodegradation of fuel oil Hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *Journal of Environmental Quality*.Vol. 29. pp: 568-578.
24. Colin F., 2000: Pollution localisés des sols et sous-sols par les hydrocarbures et les solvants chlorés. Edition Tec et Doc. Paris. 417p.
25. Crepineau C., Rychen G., Feidt C., Le roux Y., Lichtfouse E., Laurent F., 2003: Contamination of pastures by polycyclicaromatic hydrocarbons (pahs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 51. N° 16. pp: 481-485.

26. Dawson J.J.C., Godsiffe E.J., Thompson I.P., Ralebitso-Senior T.K., Killam K.S., Paton G.I., 2007: Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biology and Biochemistry* .Vol. 39. N°1 .pp:164-177.
27. Degranges P., Gugalski T., Leleu M., Greffard J., 1977: Devenir des hydrocarbures dans les sols. Rapport du BRGM.77 SGN 114 MGA. 31p.
28. Dick R.P., 1997: Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health. *Biological Indicators of Soil Health*. C.E. Pankhurst, B.M. Doubeet V.V.S.R. Gupta. United Kingdom, Cab international. pp: 121-156.
29. Dindar E.F., Sagban O., Baskaya H.S., 2015: Variations of soil enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *journal International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 105.pp: 268-275.
30. Ding K.Q., Luo Y.N., Liu S.L., 2008: Ecotoxicity effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on wheatgrowth. *J Nanjing Inst Technol*. Vol. 26.N°2. pp: 52–68.
31. Dominguez-Rosado E., Pichtel J., 2004: Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Greenhouse Studies. *Environmental Engineering Science*. Vol.21 .N°2. pp: 169-178.
32. Dommergues Y., 1968: Principes de méthodologie en microbiologie en microbiologie du sol. *Nouveaux documents pour une étude intégrée en écologie du sol*. Edition Centre National de la Recherche Scientifique. pp: 13-30.
33. Dommergues Y., Mangenot F., 1970: *Ecologie microbienne du sol*. Edition Masson.Paris. 796p.
34. Doran J.W., Safley M., 1997: Defining and Assessing Soil Health and Sustainable Productivity. *Biological Indicators of Soil Health*. C.E. Pankhurst, B.M. Doubeet V.V.S.R. Gupta. United Kingdom, Cab international. pp: 1-28.
35. Duchaufour P., 2001: *Introduction à la science du sol : sol, végétation et environnement 6ème édition : MASSON* .Paris Milan Barcelone. 498p.
36. Elsgaard L., Andersen G. H., Eriksen J., 2002: Measurement of arylsulphatase activity in agricultural soils using a simplified assay. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 34.pp: 79–82.
37. Erikson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W. W., 2003: 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.pp: 275-284.
38. Garcia J., Zhang Y., Taylor H., Cespedes O., Webb M.E., Zhou D., 2011: Multilayer enzyme-coupled magnetic nanoparticles as efficient, reusable biocatalysts and biosensors. *Nanoscale*.Vol. 3. pp: 372–382.

39. Gianfreda L., Rao M. A., Piotrowska A., Palumbo G., Colombo C., 2005: Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment*. Vol. 34. pp: 265– 279.
40. Gil-sotres F., Trasar-Cepeda C., Leiros M.C., Seoane S., 2005: Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 37.N°5. pp: 877-887.
41. Guan S.Y., 1986: Soil enzymes and research methods in Chinese. China Agricultural Science Press. pp: 274–323.
42. Guermouche m'rassi A., 2014: Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse de Doctorat. Université d'Oran. 153p.
43. Hamdi H., Benzarti S., Manusadzianas L., Aoyama I., Jedidi N., 2007: Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 39. N°8. pp: 191-199.
44. Hanna K., 2004: Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules —cagel dans la dépollution des sols. Solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. Thèse du Doctorat. Ecole doctorale : Ecole doctorale : Chimie de Lyon. 277p.
45. Haritash A. K., Kaushik C. P., 2009: Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). A review. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 169. N°1-3. pp :1-15.
46. Hennine O., Hasnaou A., 2014: Effets des hydrocarbures sur les propriétés physico-chimiques du sol et essaie de phytoremediation. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 35p.
47. Hüseyin S., 2015: Variations of soil enzyme activities in petroleum hydrocarbon contaminated soil . *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 10. pp: 268-275.
48. Ifemeje J.C., Egbuna C., 2016: Effect of Crude Oil Pollution on Soil and Proximate Composition of Cassava from Owaza in Ukwu West Local Government Area of Abia State, Nigeria. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. Vol. 15 N°. 1. pp: 202-324.
49. Jenkinson D.S., Powlson D.S., 1976: The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform. *Soil Biol.* Vol. 8. pp: 167-177.
50. Johnson A.R., Wick L.Y., Harms H., 2005: Principles of microbial PAH degradation in soil. *Environment Pollution*. Vol. 133. pp: 71-84.

51. Kang H., Freeman C., 1999: Phosphatase and arylsulphatase activities in wetland soils: annual variation and controlling factors. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 31. pp: 449-454.
52. Klamerus-Iwan A., Błońska E., Lasota J., Kalandyk A., Waligórski P., 2015: Influence of oil contamination on physical and biological properties of forest soil after chainsaw use. *Water Air Soil Pollut.* Vol. 226. N°11. pp: 389-412.
53. Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B., 2003: Effect of anthracene and pyrene on dehydrogenases activity in soils exposed and unexposed to PAHs. *Water, Air, and Soil Pollution*. Vol. 145. pp: 169–186.
54. Knight T.R., Dick R.P., 2004: Differentiating microbial and stabilized and betaglucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 36. N°12. pp: 289- 296.
55. Koller E., 2004: *Traitement des pollutions industrielles. Eau. Air. Déchets. Sols. Boues.* Edition Dunod. Paris. Série Environnement et sécurité. L'usine nouvelle. 424p.
56. Labud V., Garcia C., Hernandez T., 2007: Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*. Vol. 66. N°10. pp:186-198.
57. Lampi M., 2005: Environmental photoinduced toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Occurrence and toxicity of photomodified PAHs and predictive modeling of photoinduced toxicity. Thèse du doctorat. Université Waterloo Ontario de Canada. 128p.
58. Lemiére B., Seguin J. J., Le Guern C., Guyonnet D., Baranger Ph., Darmendrail D., Conil P., 2001: Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Application dans un Contexte d'Evaluation Détaillée des Risques pour les ressources en eau. Rapport du BRGM/RP-50662-FR. 103p.
59. Liu R., Xiao N., Wei S., Zhao L., An J., 2014: Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Science of the Total Environment*. Science of the Total Environment. pp: 350–358.
60. Maila M.P., Cloete T.E., 2005: The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants--perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* .Vol. 55 .N°1. pp: 1-8.
61. Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A., 2008: Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 7. N°3. pp: 181-191.
62. Malachowska J.A., Mirozoska J., Rozielska M., Miksch K., 1997: Enzymatic activity in soil contaminated by petroleum derivatives during the process of its detoxication. *J Biotechnol*. Vol. 36. pp: 79–91.

63. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B., 2003: Changes of Soil Microbial Properties in the Course of Pah Dissipation in Soils Artificially Contaminated with These Compounds. *PolycyclicAromatic Compounds*. Vol.23. pp: 1 - 21.
64. Mamounata D., 2012 : Peroxydase de plantes supérieures du Burkina Faso : Application à la biodégradation des composés phénoliques des effluents de tannerie. Thèse du Doctorat. Université de Burkina Faso. 288p.
65. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F., 2000: Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*.Vol. 40. pp: 339–34.
66. Martinez-Salgado M.M., Gutiérrez-Romero V., Janssens M., Ortega-Blu R., 2010: Biological soil quality indicators.A review. In: *Current Research,Technology and Microbiology and Microbial Biotechnology*. MendezVilas A (Editor.). Formatex. pp: 314-339.
67. Mccray J.E., Bai G., Maier R.M., Brusseau M.L., 2001: Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures. *Journal of Contaminant Hydrology*.Vol. 48. N° 1-2. pp: 45-68.
68. Mochalova O.S., Antonova N.M., Gurvich L.M., 2002: The role of dispersants in the processes of oiltransformation and oxidation in aquatic environment. *Water Resources*. Vol. 29. N° 2. pp: 202-205.
69. Mohanty M., Kumar-Dhal N., Patra P., Das B., Rama-Reddy P. S., 2010: Phytoremediation: A Novel Approach for Utilization of Iron-ore Wastes. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*.Vol. 206. pp: 29-47.
70. Mohsenzadeh F., Chehregani Rad A., AkbariM., 2012: Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils.*Iranian J Environ Health Sci Eng*. Vol. 9.N°1. pp: 26.
71. Murphy E.M., Zachara J.M., Smith S.C., 1990: Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds. *Environmental Science and Technology*.Vol. 24.N° 10. pp: 150-169.
72. Ogbo E.M., 2008: Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachishypogaea*, *Vignaunguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Environmental Science and Technology*.Vol. 8.N° 2. pp: 250-253.
73. Ogbo E.M., Zibigha M., Odogu G., 2009: The effect of crude oil on growth of the weed (*Paspalumscrobiculatum* L.) phytoremediation potential of the plant. *African Journal of Environmental Science and Technology*.Vol. 3. N°9. pp: 229-233.
74. Onojake M.C., Osuji L.C., 2012: Assesmtment of the physio chemical properties of hydrocarbon contaminated soil. *Archives of Applied Science Research*.Vol. 4. pp: 48-58.

75. Park J.H., Zhao X., Voice T.C., 2001: Biodegradation of Non-desorbable Naphthalene in Soils. *Environmental Science and Technology*. Vol. 35. N° 13. pp: 2734-2740.
76. Parus A., Szulc P., Zbyszek Z., 2017: Effect of petroleum derivatives contaminated soil on germination and early growth of chosen plants. *Poznan University of Technology, Institute of Chemical Technology and Engineering*. ResearchGate. Vol.11. pp: 60-632.
77. Patej S., 2002: Etude de scenarios dangereux en stations-service. Rapport final de l'INERIS DRA 40862. 38p.
78. Perez-Leblic M.I., Turmero A., Hernandez M., Hernandez A.J., Pastor J., Ball A.S., Rodriguez J., Arias M.E., 2012: Influence of xenobiotic contaminants on land fill soil microbial activity and diversity. *J. Environ. Manage.* Vol. 95. pp: 285–290.
79. Ramade F., 2007: Introduction à l'écotoxicologie. Fondements et applications. Edition Tec et Doc. Lavoisier. 618p.
80. Rao M.A., Scelza R., Acevedo F., Diez M.C., Gianfreda L., 2015: Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*. Vol. 107. pp:145–162.
81. Rivière J., Gatellier C., 1976: Evolution de la microflore d'un sol imprégné d'hydrocarbures. *Ann. Agron.* Vol. 27. pp: 85-99.
82. Rivière J.L., 1998 a: Evaluation du risque écologique des sols pollués. Edition Lavoisier Tec et Doc. Paris. 230p.
83. Rivière J. L., 1998 b: Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Lavoisier Tec et Doc. Paris. 204p.
84. Rouquerol T., Amir H., Amir A., 1987: Effets de l'épandage de résidus pétroliers de raffinerie sur l'évolution de la matière organique. L'activité de la densité microbienne d'un sol agricole. *Revue d'écologie et de biologie du sol*. Vol. 24. N° 2. pp: 137-156.
85. Saada A., Nowak C., Coquereau N., 2005: Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures. Rapport du BRGM. RP 53739-FR. 107p.
86. Schnoor J.L., Mccutcheon S.C., Steven C., 2003: Phytoremediation- transformation and control of contaminants. Dans *Wiley-interscience, Inc, NJ, USA*, 987p.
87. Serrano A., Tejada M., Gallego M., Gonzalez J.L., 2009: Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. *Science of The Total Environment*. Vol. 407. N°13. pp: 456-461.
88. Skujiņš J., Burns R.G., 2008: Extracellular Enzymes in Soil. *Send to CRC Crit Rev Microbiol*. Vol. 4. N°4. pp: 383-421.

89. Soldatkin O.O., Kucherenko I.S., Pyeshkova V.M., Kukla A.L., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., 2012: Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavymetal ions. *Bioelectrochemistry*. Vol. 83. pp: 25-35.
90. Soltani M., 2004: Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram – négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse du Doctorat. Université de Paris 6. 284p.
91. Sonatrach., 2010. [www.Algerie-energie.com](http://www.Algerie-energie.com).
92. Stegmann R. Brunner G. Calmano W. Matz G., 2001: Treatment of contaminated soil, fundamentals analysis applications. Edition Springer Science and Business Media. Lyon. 658p.
93. Sulaiman A., Alrumman S.A., Dominic B., Standing A., Graeme I.P., 2015: Effects of hydrocarbon contamination on soilmicrobial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University – Science*.Vol. 27. pp: 31–4.
94. Sutton B.N., Maphosa F., Morillo A.J., Abu Al soud W., Langenhoff A.M., Grotenhuis T., Rijnaarts H.M., Smidt H., 2013: Impact of Long-Term Diesel Contamination on Soil Microbial Community Structure. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 79.N°2. pp: 619–630.
95. Tang L., Niu X., Sun Q., Wang R., 2010: Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of ryegrass with effective microorganisms. *J Environ Technol Engin*. Vol. 3. pp: 80–86.
96. Técher D., 2011: Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. Thèse du doctorat. Université Paul Verlaine de Metz. 314p.
97. Tejada M., Gonzalez J.L., Hernandez M.T., Garcia C., 2008: Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil (Effect on soil microbial properties) .*Bioresource Technology*. Vol.8. N°99. pp: 282-290.
98. Thiele S., Brümmer G. W., 2002: Bioformation of polycyclicaromatichydrocarbons in soilunderoxygen deficient conditions. *Soil Biology and Biochemistry*.Vol. 34.N° 5. pp: 733-735.
99. Timmerman M.D., Fuller L.G.,Burton D.L., 2002: The effects of a crude oil spill on microbiological indices of soil biological quality. Department of Soil Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.Vol.41. pp: 173-180.
100. Turgay O.C., Erdogan E.E., Karaca A., 2010: Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbon and soil quality in crude-oil contaminated soil. *Environ.Monit. Assess*. Vol. 170. pp: 45–58.

101. Vioko D.E., Fashemi D.S., 2005: Growth response of *Ricinus communis* (Castor oil) in spent lubricating oil-polluted soil. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. Vol. 9. N°2. pp: 73-79.
102. Wang X., Bertha R., 1990: Effects of bioremediation on residues, Activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. *Soil Biol. Biochemosphere*. Vol. 22. pp: 501-505.
103. Wilcke W., Amelung W., Martius C., Garcia M.V.B., Zech W., 2000: Biological Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Amazonian Rain Forest. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. Vol. 163. N° 1. pp: 27-30.
104. Wilcke W., 2007: Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma*. Vol. 141. N° 3-4. pp: 157-166.
105. Wyszowska J., Kucharski J., Waldowska E., 2002: The influence of diesel oil contamination on soil enzymes activity. *Original Research*. Vol. 48. pp: 241-259.
106. Wyszowska J, Kucharski M., Kucharski J., 2006: Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by diesel oil. *Polish Journal of Environmental Studies*. Vol. 15. N° 3. pp: 501-506.
107. Zhang B., Deng H., Wang H.L., Yin R., Hallett P.D., Griffiths B.S., Daniell T.J., 2010: Does microbial habitat or community structure drive the functional stability of microbes to stresses following re-vegetation of a severely degraded soil?. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 42. N°5. pp: 850-859.

# Liste des annexes

## Liste des annexes :

**Annexe I :** les résultats bruts de tous les paramètres.

### 1. Le test respirométrique.

Sol	V acide ml	V NAOH fixé	masse CO <sub>2</sub> fixé mg /100 g du sol	C-CO <sub>2</sub> (mg /100g du sol)
sol NC	2,7	12,825	141,075	38,475
sol NC	3,3	15,675	172,425	47,025
sol NC	3,1	14,725	161,975	44,175
sol C	5,4	25,65	282,15	76,95
sol C	5,5	26,125	287,375	78,375
sol C	5	23,75	261,25	71,25

### 2. Le taux de minéralisation de carbone.

C-CO <sub>2</sub>	C-CO <sub>2</sub> /C totale (%)
38,475	19,0470297
47,025	23,279703
44,175	21,8688119
76,95	38,0940594
78,375	38,799505
71,25	35,2722772

Le carbone total dans le sol non contaminé 2,02%

### 3. La biomasse microbienne.

Sol	volume (ml)
sol NC(F)	0,14
sol NC (F)	0,12
sol NC (F)	0,12
sol NC (NF)	0,08
sol NC (NF)	0,07
sol NC (NF)	0,05
sol C (F)	0,3
sol C (F)	0,29
sol C (F)	0,3
sol C (NF)	0,1
sol C (NF)	0,12
sol C (NF)	0,1

#### 4. Activité de la DHO (la spectrophotométrie) .

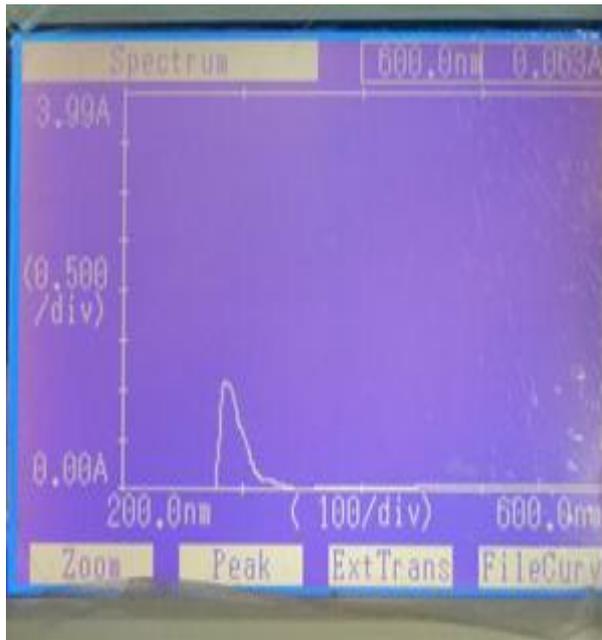
Sol (NC) : 1<sup>ère</sup> répétition



Sol (NC) : 2<sup>ème</sup> répétition



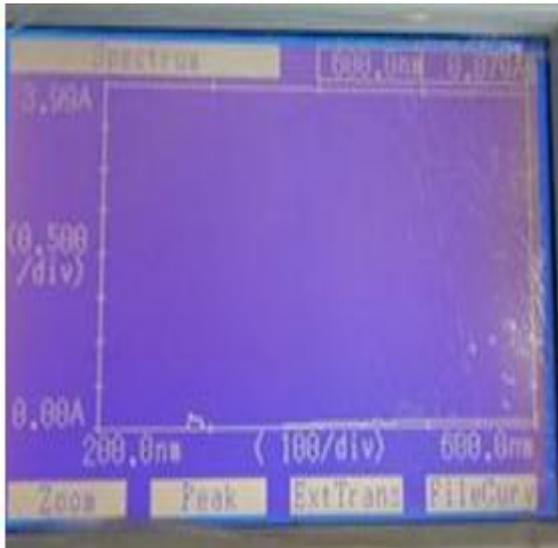
Sol (C) : 1<sup>ère</sup> répétition



Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
477.0	0.063		
454.0	0.056		
418.0	0.044		
286.0	1.086		

Navigation buttons 'Graph' and 'Valley' are visible at the bottom.

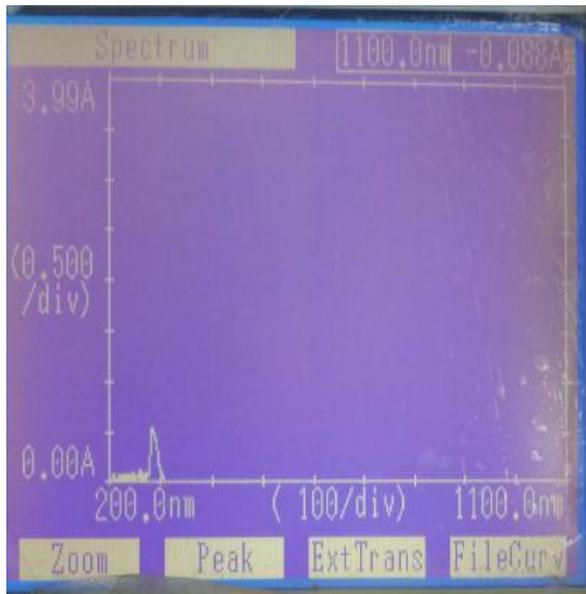
Sol (C) : 2<sup>ème</sup> répétition



Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
475.0	0.880		
454.0	0.071		
416.0	0.053		
283.0	0.168		

Navigation buttons 'Graph' and 'Valley' are visible at the bottom.

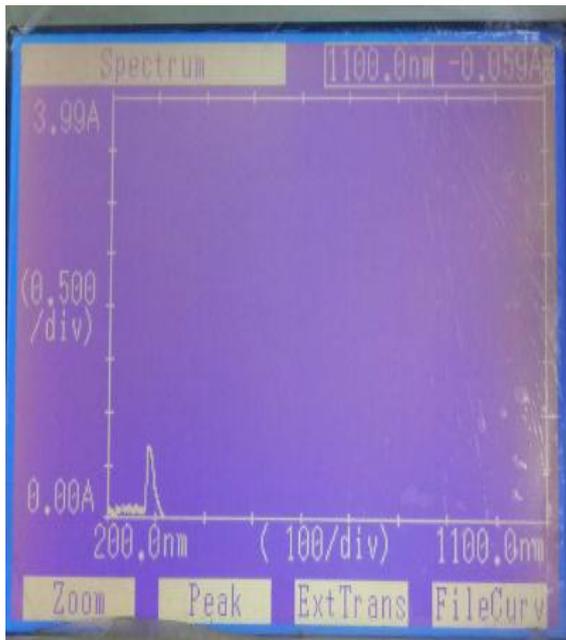
Témoins « 1 » Sol (NC) :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1067.0	-0.026		
1030.0	-0.054		
913.0	-0.024		
814.0	-0.046		
753.0	-0.048		
685.0	-0.045		
485.0	-0.059		
461.0	-0.053		
437.0	-0.052		
284.0	0.539		

Graph [ ] Valley

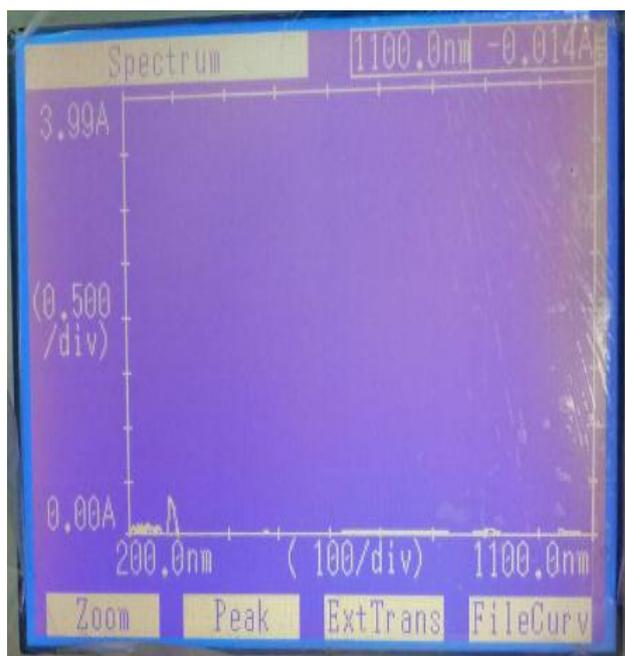
Témoins « 2 » Sol (NC) :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1054.0	-0.008		
913.0	0.009		
813.0	-0.012		
755.0	-0.014		
699.0	-0.010		
640.0	-0.010		
476.0	-0.017		
457.0	-0.016		
432.0	-0.018		
285.0	0.680		

Graph [ ] Valley

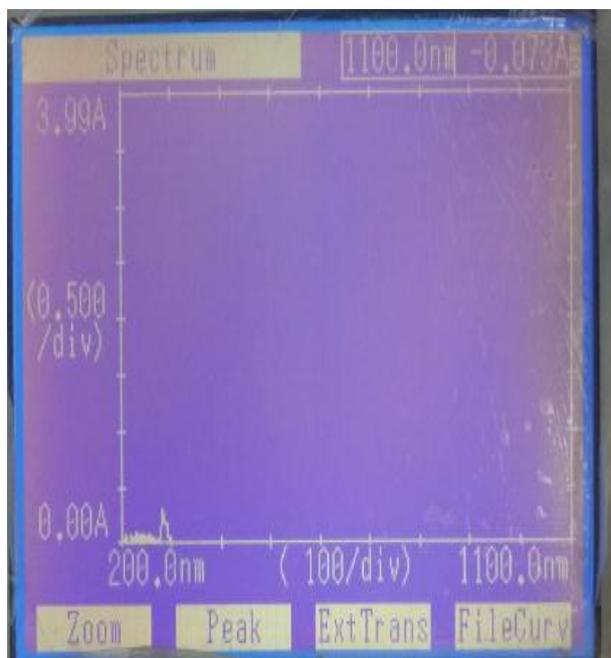
Témoins « 1 » sol (C) :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1042.0	0.052	284.0	0.347
1022.0	-0.007		
911.0	0.049		
814.0	0.029		
755.0	0.026		
703.0	0.028		
639.0	0.034		
476.0	0.024		
454.0	0.021		
419.0	0.011		

Graph  Valley

Témoins « 2 » Sol (C) :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1057.0	-0.018	283.0	0.299
1030.0	-0.022		
913.0	0.003		
813.0	-0.020		
762.0	-0.022		
686.0	-0.018		
487.0	-0.031		
462.0	-0.025		
437.0	-0.023		
322.0	-0.088		

Graph  Valley

## 5. Activité de la PPO.

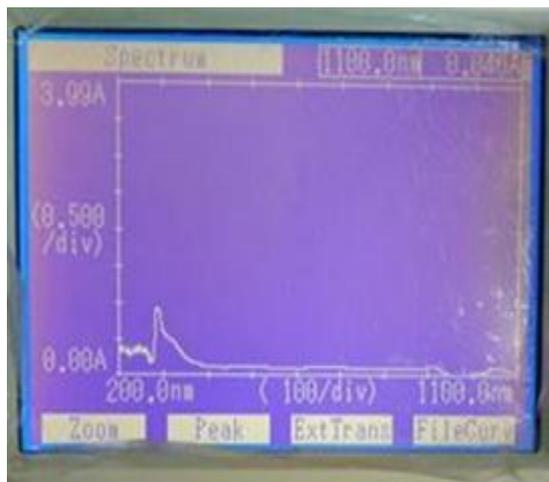
Sol (NC) : 1<sup>ère</sup> répétition



Sol (NC) : 2<sup>ème</sup> répétition



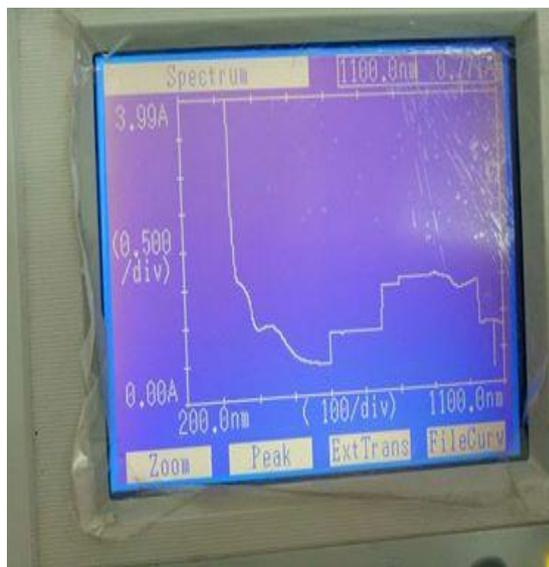
Sol (C) : 1<sup>ère</sup> répétition



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1842.8	0.115		
1822.8	0.057		
910.8	0.122		
886.8	0.109		
879.8	0.117		
639.8	0.125		
476.8	0.128		
455.8	0.125		
290.8	0.921		

Graph      Valley

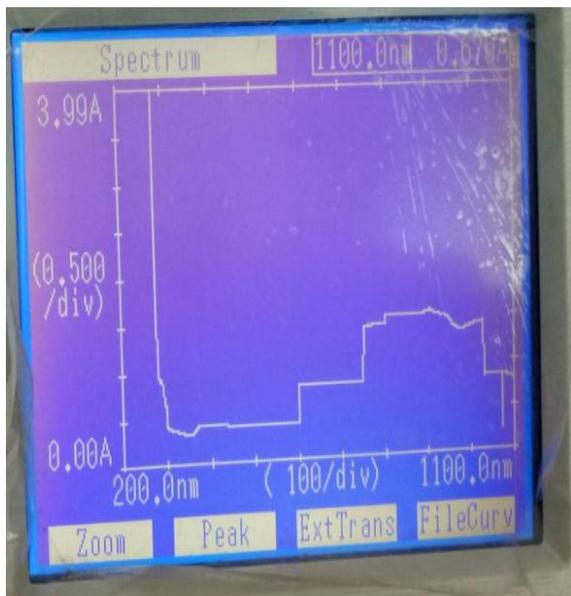
Sol (C) : 2<sup>ème</sup> répétition



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1875.8	0.853		
905.8	1.565		
803.8	1.532		
650.8	0.835		
431.8	0.979		

Graph      Valley

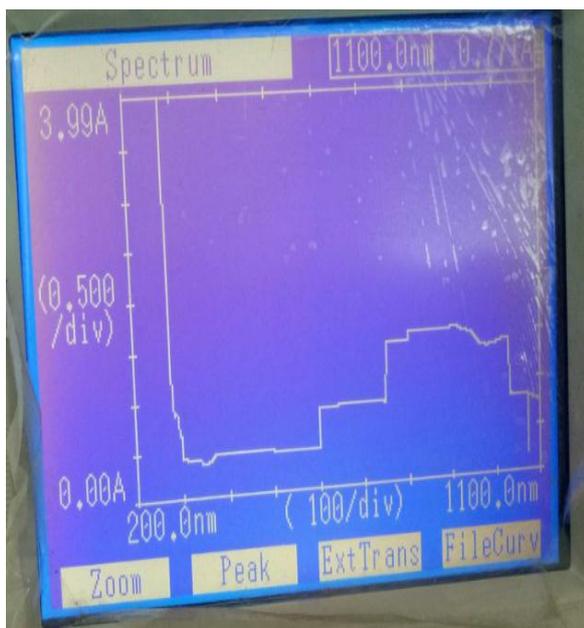
Témoin « 1 » (sans sol) :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1049.0	0.845		
905.0	1.564		
806.0	1.526		
738.0	0.815		
646.0	0.818		
624.0	0.820		
576.0	0.409		
537.0	0.405		
467.0	0.410		
388.0	0.422		

Graph Valley

Témoin « 2 » (sans sol)

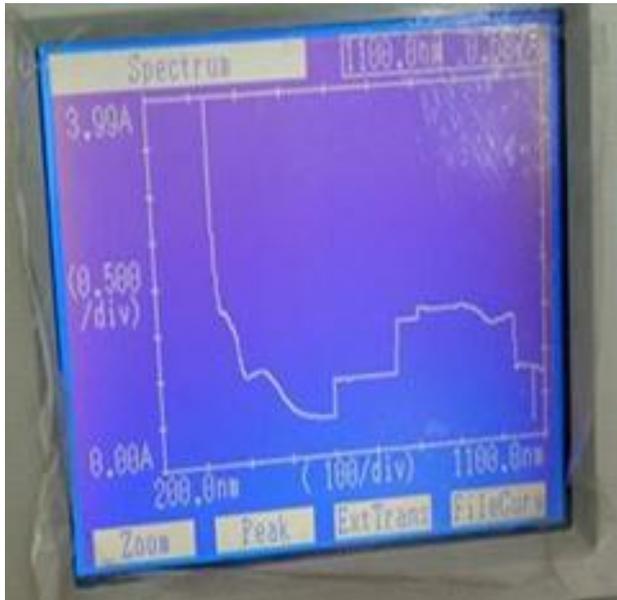


Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1029.0	1.417		
905.0	1.580		
714.0	0.852		
627.0	0.842		
469.0	0.443		
452.0	0.443		
418.0	0.448		

Graph Valley

## 6. Activité de la POD .

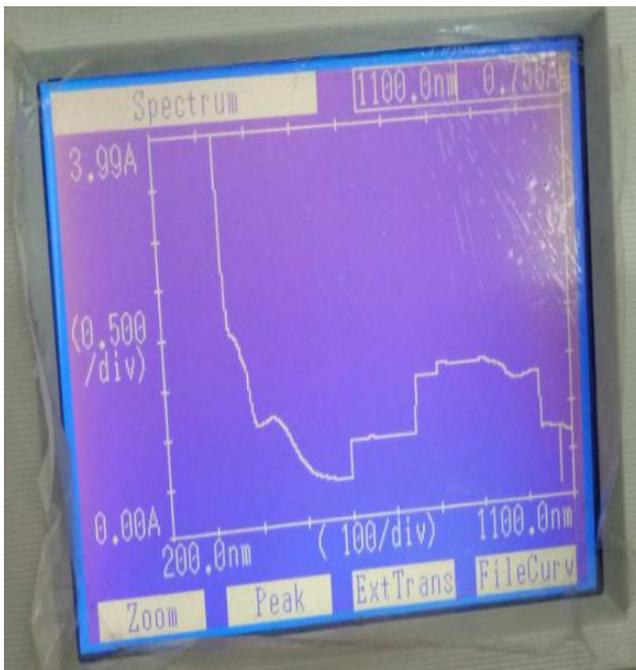
Sol (NC) : 1<sup>ère</sup> répétition



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1041.0	0.835		
1021.0	1.406		
905.0	1.580		
801.0	1.563		
701.0	0.864		
629.0	0.850		
432.0	1.027		

Graph      Valley

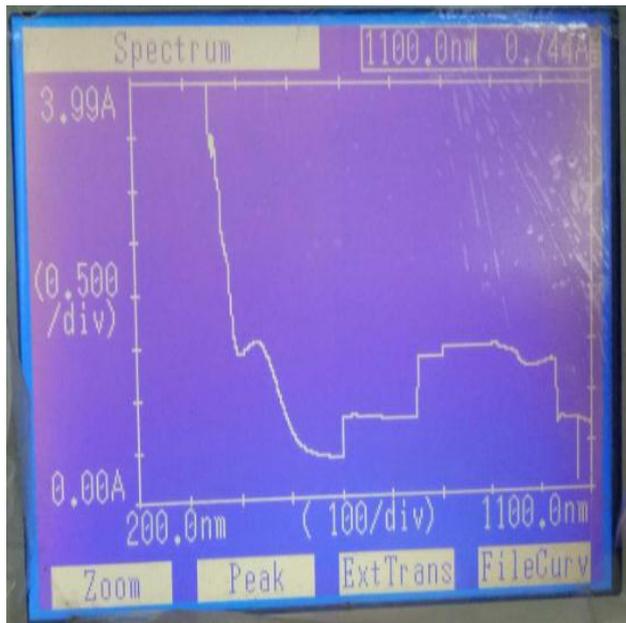
Sol (NC) : 2<sup>ème</sup> répétition



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1042.0	0.766		
905.0	1.533		
801.0	1.519		
646.0	0.827		
628.0	0.825		
432.0	1.127		

Graph      Valley

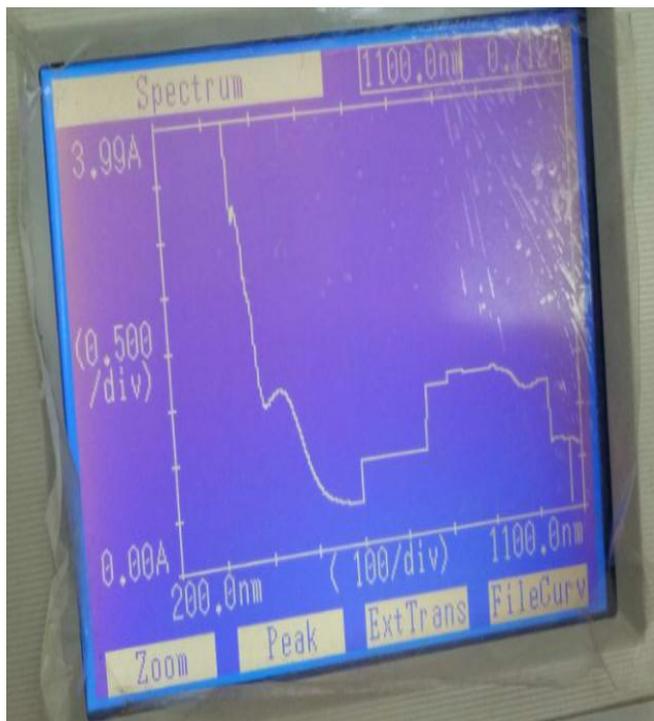
Sol (C) : 1<sup>ère</sup> répétition



Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1041.0	0.739		
1022.0	1.308		
905.0	1.480		
802.0	1.467		
645.0	0.794		
625.0	0.804		
431.0	1.555		

Graph Valley

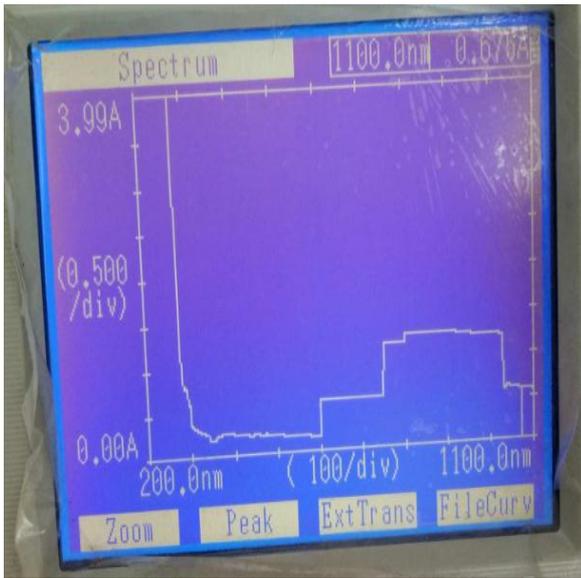
Sol (C): 2<sup>ème</sup> répétition



Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1042.0	0.701		
1021.0	1.283		
905.0	1.481		
801.0	1.483		
643.0	0.801		
431.0	1.550		

Graph Valley

Témoïn 1<sup>ère</sup> répétition (sans sol) :

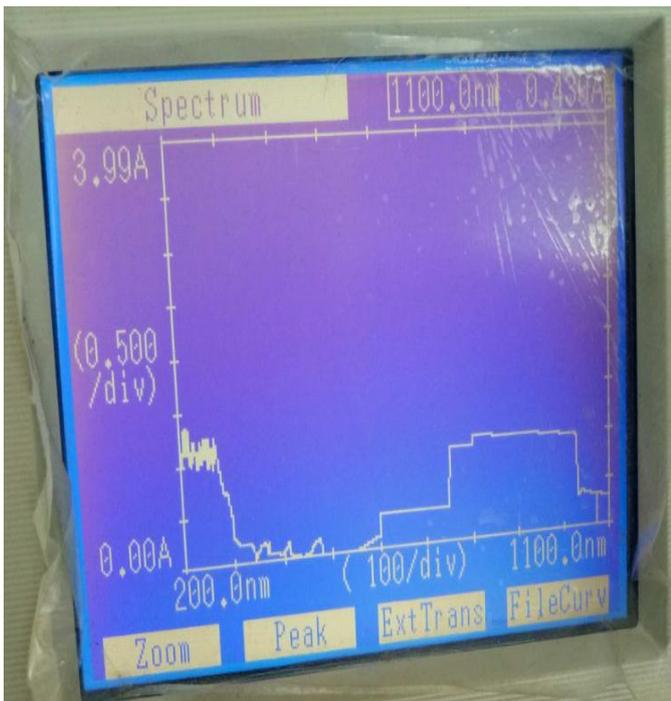


Peak detection

Abcis.	ABS	Abcis.	ABS
1040.0	0.631		
1007.0	1.222		
903.0	1.269		
801.0	1.276		
640.0	0.586		
473.0	0.231		
452.0	0.236		
377.0	0.261		

Graph Valley

Témoïn 2<sup>ème</sup> répétition (sans sol) :



Peak detection

Abcis.	ABS	Abcis.	ABS
1040.0	0.382		
801.0	1.041		
638.0	0.365		
602.0	0.365		
476.0	0.182		
412.0	0.176		
370.0	0.186		
323.0	0.198		
268.0	1.254		

Graph Valley

7. Activité de catalase (le volume de  $\text{KMnO}_4$  qui y a réagi avec le  $\text{H}_2\text{O}_2$ )

sol	Volume (ml)
Sol NC	0,2
Sol NC	0,3
Sol C	0,2
Sol C	0,12

Témoin sans sol

1 <sup>er</sup> répétition	1,8
2 <sup>ème</sup> répétition	1,7

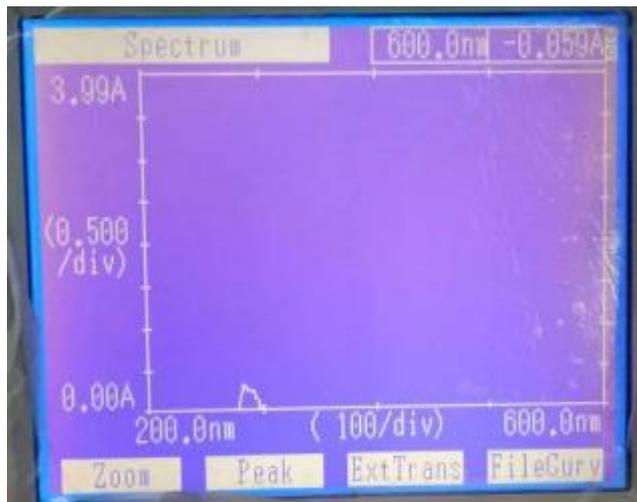
8. Quantité des hydrocarbures totaux.

sol	g
sol NC	1
Sol NC	0,8
Sol C	3
Sol C	3

9. Analyse qualitative des hydrocarbures (Résultats obtenus par la spectrophotométrie UV).

Sol	Répétition	Longueur d'onde	Absorbance
Sol C	1	294	2,997
Sol C	2	297	2,630
Sol C	2	286	1,086
Sol C	2	295	2,467
Sol NC	1	282	0,321
Sol NC	2	285	0,768

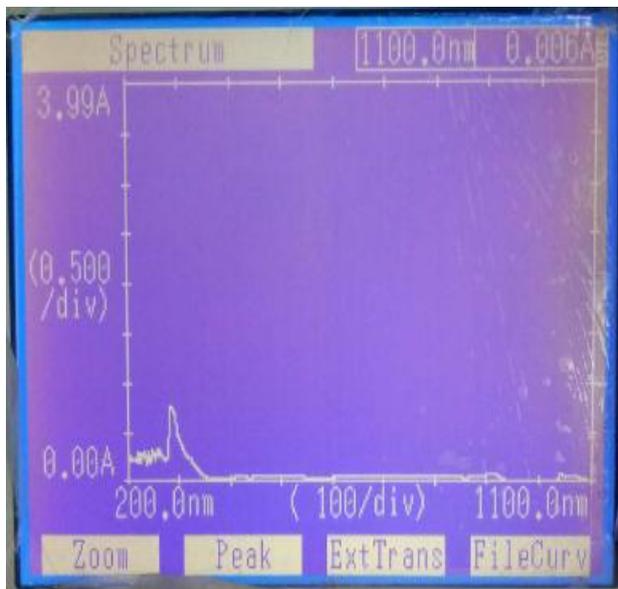
Sol (NC) 1<sup>ère</sup> répétition



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
463.0	-0.068		
441.0	-0.070		
282.0	0.321		

Graph      Valley

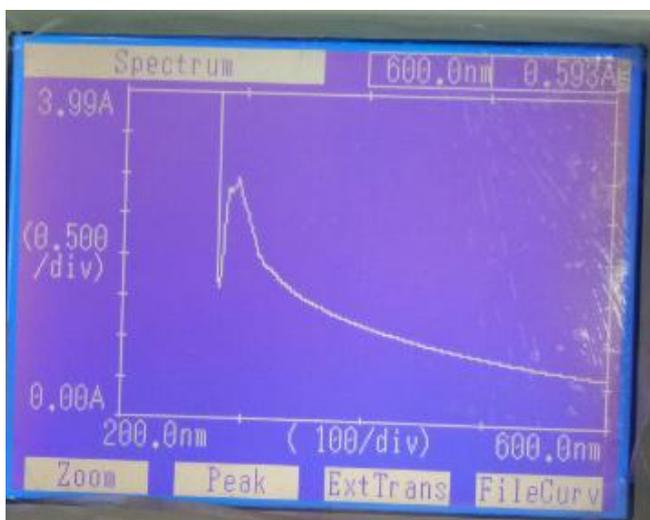
Sol (NC) 2<sup>ème</sup> répétition :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1042.0	0.071	285.0	0.768
1023.0	0.015		
911.0	0.075		
810.0	0.057		
755.0	0.055		
694.0	0.059		
639.0	0.063		
476.0	0.059		
453.0	0.057		
417.0	0.048		

Graph      Valley

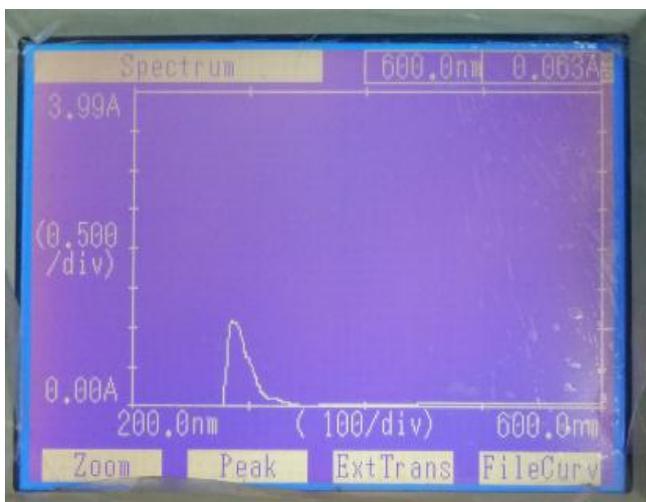
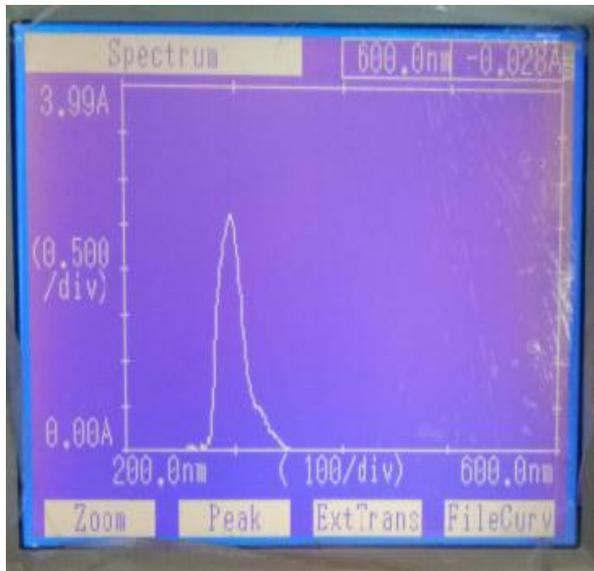
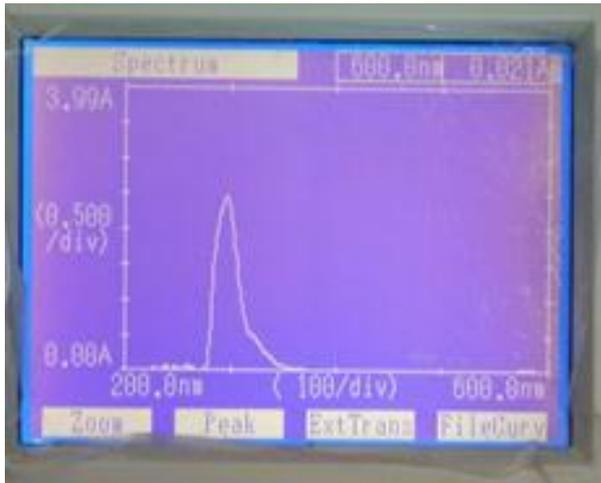
Sol (C) : 1<sup>ère</sup> répétition



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
294.0	2.977		

Graph      Valley

Sol (C) : 2<sup>ème</sup> répétition



## 10. Test de germination des graines de maïs et de laitue

sol	Nombre de graines germés maïs	Nombre de graines germés laitue
sol NC	6	12
sol NC	6	14
sol NC	7	12
sol C	4	3
sol C	4	3
sol C	4	5

Témoin

1 <sup>ère</sup> répétition	8	16
2 <sup>ème</sup> répétition	14	15

## 11. Elongation racinaire de maïs et la laitue.

Maïs

type du sol	répétition (boite)	1 <sup>er</sup> mesure (cm)	2 <sup>ème</sup> mesure (cm)
sol NC	1	0,5	1
sol NC	1	1,22	1,9
sol NC	2	1,3	1,9
sol NC	2	1,3	1,9
sol NC	2	1,2	1,7
sol NC	3	2,8	3
sol NC	3	2,7	2,9
sol NC	3	2,2	2,7
sol C	3	2,1	3,4
sol C	1	1,9	2
sol C	1	1,6	1,68
sol C	2	1,4	1,5
sol C	3	0,9	1

Témoin

Sable	1	1,3	4,5
Sable	1	0,3	5
Sable	2	0,2	0,9

## Laitue

type du sol	répétition boîte	1 <sup>er</sup> mesure	2 <sup>ème</sup> mesure
Sol NC	1	2,3	2,78
sol NC	1	2,5	2,6
sol NC	1	1,7	1,8
sol NC	1	1,5	1,7
sol NC	2	2,5	2,8
sol NC	2	1,8	2,1
sol NC	2	1,6	2
sol NC	2	1,9	2
sol NC	3	1,6	1,7
sol NC	3	1,2	1,4
sol NC	3	1	1,2
sol NC	3	1	1,3
sol C	1	2,2	2,4
sol C	1	2,3	2,5
sol C	1	2,6	2,7
sol C	1	2,4	2,6
sol C	1	2,6	2,7
sol C	2	1,4	1,5
sol C	3	0,4	0,53

## Témoin :

Sable	1	0,5	1
Sable	1	0,3	0,8
Sable	2	0,2	0,8
Sable	2	0,3	1

## Annexe II : Test de Student pour le test respirométrique.

```
> t.test(ABG[sol=="sol1"],ABG[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: ABG[sol == "sol1"] and ABG[sol == "sol2"]
t = -9.7143, df = 3.92, p-value = 0.0006938
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -41.60646 -22.99354
sample estimates:
mean of x mean of y
 43.225    75.525
```

## Annexe III : Test de Student pour le taux de minéralisation de carbone.

```
> t.test(miné[sol=="sol1"],miné[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: miné[sol == "sol1"] and miné[sol == "sol2"]
t = -9.7143, df = 3.92, p-value = 0.0006938
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -5.073958 -2.804090
sample estimates:
mean of x mean of y
 5.271341  9.210366
```

## Annexe IV : Test de Student pour la biomasse microbienne.

```
> t.test(BM[sol=="sol1"],BM[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: BM[sol == "sol1"] and BM[sol == "sol2"]
t = -11.2583, df = 3.2, p-value = 0.00111
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -26.78195 -15.29700
sample estimates:
mean of x mean of y
 9.710526 30.750000
```

### Annexe V : Test de Student pour l'activité de la DHO .

```
> t.test(DHO[sol=="sol1"],DHO[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: DHO[sol == "sol1"] and DHO[sol == "sol2"]
t = -35.7638, df = 1.908, p-value = 0.001023
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.02578625 -0.02001375
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.0196    0.0425
```

### Annexe VI : Test de Student pour l'activité de la PPO.

```
> t.test(ppo[sol=="sol1"],ppo[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: ppo[sol == "sol1"] and ppo[sol == "sol2"]
t = -24.0416, df = 2, p-value = 0.001726
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.2004243 -0.1395757
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.36425    0.53425
```

### Annexe VII : Test de Student pour l'activité de la POD.

```
> t.test(pod[sol=="sol1"],pod[sol=="sol2"],var.equal=T)

Two Sample t-test

data: pod[sol == "sol1"] and pod[sol == "sol2"]
t = -9.4981, df = 2, p-value = 0.0109
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.6909014 -0.2600986
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.9465    1.4220
```

## Annexe VII : Test de Student pour l'activité de la CAT .

```
> t.test(CAT[sol=="sol1"],CAT[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data:  CAT[sol == "sol1"] and CAT[sol == "sol2"]
t = -1.4023, df = 1.877, p-value = 0.3034
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -4.910518e-08  2.610518e-08
sample estimates:
 mean of x  mean of y
0.002229801 0.002229813
```

## Annexe IX : Test de Student pour l'évaluation de la quantité des hydrocarbures totaux.

```
4.45
> t.test(ex[sol=="sol1"],ex[sol=="sol2"],var.equal=T)

Two Sample t-test

data:  ex[sol == "sol1"] and ex[sol == "sol2"]
t = -21, df = 2, p-value = 0.00226
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -2.530265 -1.669735
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.9      3.0
```

## Annexe X : Test de Student pour le taux de germination de maïs

```
> t.test(zea[sol=="sol1"],zea[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data:  zea[sol == "sol1"] and zea[sol == "sol2"]
t = 7, df = 2, p-value = 0.0198
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 4.495579 18.837755
sample estimates:
mean of x mean of y
31.66667 20.00000
```

## Annexe XI : Test de Student pour le taux de germination de laitue

```
> t.test(laitue[sol=="sol1"],laitue[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: laitue[sol == "sol1"] and laitue[sol == "sol2"]
t = 9.5459, df = 4, p-value = 0.0006726
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 31.91171 58.08829
sample estimates:
mean of x mean of y
 63.33333  18.33333
```

## Annexe XII : Test de Student pour l'élongation racinaire de maïs

```
> t.test(ERMM[sol=="sol1"],ERMM[sol=="sol2"],var.equal=T)

Two Sample t-test

data: ERMM[sol == "sol1"] and ERMM[sol == "sol2"]
t = 10.3221, df = 4, p-value = 0.000497
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.3679470 0.6387196
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.6033333 0.1000000
```

## Annexe XII : Test de Student pour l'élongation racinaire de laitue

```
> t.test(ERL[sol=="sol1"],ERL[sol=="sol2"],var.equal=F)

Welch Two Sample t-test

data: ERL[sol == "sol1"] and ERL[sol == "sol2"]
t = 3.5882, df = 3.76, p-value = 0.02552
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.02098114 0.18235219
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.2316667 0.1300000
```

## **Résumé :**

Le présent travail a pour objectifs d'étudier l'effet de la contamination par les hydrocarbures sur les propriétés biologiques (biomasse et respiration microbiennes, activité enzymatique et fertilité) d'un sol prélevé dans une station-service en les comparants à celles d'un sol non contaminé.

Les résultats obtenus ont montré que les carburants affectent positivement les propriétés biologiques du sol notamment l'activité enzymatique (DHO, PPO et POD) tandis qu'ils n'ont exercé aucun effet significatif sur l'activité de la catalase. Ils ont eu un impact négatif sur la germination et l'élongation racinaire du maïs et de la laitue.

D'après toute ces analyses, nous pouvons conclure que l'évaluation de la qualité biologique du sol notamment l'activité enzymatique s'est révélée assez satisfaisante pour la quantification de l'impact des carburants sur le sol.

*Les mots clés :* effet, hydrocarbures, propriétés biologiques, activité enzymatique, qualité biologique

## **Abstract :**

The purpose of this work is to study the effect of hydrocarbon contamination on biological properties (microbial biomass and respiration, enzymatic activity and fertility) of a soil taken from a service station by comparison with those of an uncontaminated soil.

The results showed that these fuels positively affected the biological properties of the soil, particularly the enzymatic activity (DHO, PPO, POD), whereas they had no significant effect on the activity of catalase. Negative impact was only exhibited on the germination and the root growth of maize and lettuce.

From these analyses, we can conclude that the evaluation of the soil biological quality particularly the enzymatic activity, proved to be quite satisfactory for the quantification of the impact of the fuels on soil.

*Key words :* impact ,hydrocarbons, biological properties, enzymatic activity, biological quality.