

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
En Ecologie et Environnement
Spécialité : Biodiversité et Environnement

Thème

**Comparaison de l'efficacité des
techniques de dépollution
(Phytoremédiation, Biostimulation et
Bioaugmentation) d'un sol contaminé
aux hydrocarbures.**

Présenté par : M^{elle} HAMITOUCHE Ghania

M^{elle} HENADCI Roza

Devant le jury :

Présidente : M ^{me} LANDRI G.	M.A.A à L'U.M.M.T.O
Promotrice : M ^{elle} Ali AHMED S.	M.A.A à L'U.M.M.T.O
Examinatrice : M ^{me} SAHMOUNE F.	M.A.A à L'U.M.M.T.O

Promotion 2018

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier le Bon Dieu le Tout Puissant et Miséricordieux, qui nous a données le courage, la santé, la force et la patience pour accomplir ce modeste travail.

Nous remercions très chaleureusement notre promotrice M^{elle} Ali Ahmed S., MAA au département de biologie à l'UMMTO, pour sa patience, son encouragement et son soutien qui nous a été précieux afin de mener notre travail à bon port.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, à la présidente M^{me} Landri G., MAA à l'UMMTO et à l'examinatrice M^{me} Sahmoune F., MAA à l'UMMTO pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner ce travail.

Nous adressons aussi nos plus sincères remerciements à la responsable de notre spécialité Biodiversité et Environnement, Madame Ali Ahmed Sadoudi D., Professeur à l'UMMTO.

Nous remercions également tout le personnel des laboratoires communs 1 et 2, ainsi que l'ingénieur du laboratoire "Pathologie des écosystèmes" M^{elle} Abrous H., la responsable des laboratoires de chimie M^{me} Bouabdallah S. ainsi que l'ingénieur du laboratoire M^{me} Kara H. et Mr Sadou S. doctorant en biologie, pour leurs aides et leurs encouragements tout au long du travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à Monsieur Amrani S. Professeur à l'USTHB pour son aide précieuse, notamment dans le dosage de l'activité enzymatique.

Enfin, nous tenons également à remercier nos enseignants pour nous avoir formées tout au long de notre cycle d'étude et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma chère mère, à mon cher père,
Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir
et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs. Que dieu leur procure bonne
santé et longue vie.

A mes frères, à ma chère sœur et son mari et ma chère nièce,
Pour leurs indéfectibles soutiens, leurs patiences infinies et leurs conseils précieux tout au
long de mes études.

A ma chère binôme Ghania,
Pour son entente et sa sympathie.

A toute ma famille,

A toutes les personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes
côtés, et qui m'ont accompagnés durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables
ami(e)s, collègues d'étude.

Roza



Dédicace

Ce modeste travail est dédié :

A ma chère mère **Ouardia**,

A mon cher père **Slimane**,

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A ma chère sœur **Tinhinane** et mes chers frères **Ghani** et **Amer**, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mon fiancé **Rachid**,

A ma chère binôme **Roza**,

Et à tous mes proches de la famille HAMITOUCHE, et plus particulièrement, la famille de mon fiancé HAMITECHE.

Pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

A tous mes ami(e)s et collègues d'étude.

Ghania

Liste des abréviations

A : Absorbance.

BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylènes.

CAT : Catalase.

DHO : Déshydrogénase

HAP : Hydrocarbures aromatique polycycliques.

HC : Hydrocarbures.

HCT : Hydrocarbures totaux.

MO : Matière organique.

NC : Non contaminé.

POD : Peroxydase

PPO : Polyphénoloxydase

P. : *Pseudomonas*.

Sol C : Sol contaminé.

Liste de figures

Fig.1: Sources de pollution du sol dans une station-service	4
Fig.2: Composition des carburants	5
Fig.3: Récapitulatif de différents processus de phytoremédiation.....	11
Fig.4: Protocole de mesure de la respiration microbienne	17
Fig.5: Protocole de la technique fumigation-extraction.....	18
Fig.6: Protocole de dosage du carbone organique.	19
Fig.7: Protocole de l'activité de CAT.....	20
Fig.8: Protocole de l'activité de PPO.....	21
Fig.9: Protocole de l'activité de POD	22
Fig.10: Protocole de l'activité de DHO.....	23
Fig.11: Protocole de l'extraction des hydrocarbures résiduels.....	24
Fig.12: Production de CO ₂ cumulée.	26
Fig.13: Taux de minéralisation du carbone induits par les différents traitements du sol.	27
Fig.14: Biomasse microbienne dans les différents traitements du sol.	28
Fig.15: Activité de la catalase dans les différents traitements.....	29
Fig.16: Activité de polyphénoloxydase (PPO).....	30
Fig.17: Activité de peroxydase (POD) dans les sols traités différemment.	31
Fig.18: Activité de déshydrogénase (DHO).	32
Fig.19: Quantité des HC dans les différents sols.	32
Fig.20: Taux de germination du maïs dans les différents sols.	34
Fig.21: Taux de germination de laitue dans les différents sols.	35
Fig.22: Elongation racinaire du maïs dans les différents sols.	36
Fig.23: Elongation racinaire de la laitue dans les différents sols.	37

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques de l'essence et du gas-oil.....	5
Tableau 2: Autres techniques de bioremédiation.....	13
Tableau 3: Caractéristiques du sol provenant de la station-service.	15
Tableau 4: Analyse des HC par spectroscopie UV.....	33

Sommaire

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	3
I-Contamination du sol par les hydrocarbures :	3
I-1-Définition des hydrocarbures :.....	3
I-2-Sources des hydrocarbures :	3
I-3-Sources de pollution dans les stations-service :.....	4
I-4-Comportement des hydrocarbures dans l'environnement :.....	5
I-5-Effets des hydrocarbures	7
II-Techniques de décontamination du sol pollué :	10
II-1-Atténuation naturelle :.....	10
II-2-Phytoremédiation :.....	10
II-3-Biostimulation :	12
II-4-Bioaugmentation :.....	13
II-5-Autres techniques de dépollution :.....	13
III-Evaluation de l'efficacité de techniques de dépollution du sol (qualité biologique des sols) :.....	14
Chapitre II : Matériels et méthodes	15
I-Matériels :.....	15
I-1-Sol:	15
I-2-Matériel végétal :	16
II-Méthodes :.....	16
II-1-Indicateurs biologiques de la qualité du sol :	16
II-2-Analyse des hydrocarbures:.....	23
II-3-Test d'écotoxicité :.....	24

III-Analyse statistique des données :.....	25
Chapitre III : Résultats et discussion.	26
I-Résultats :	26
I-1-Effet des hydrocarbures sur les paramètres biologiques du sol :.....	26
I-2-Analyse des HC :.....	32
I-3- Effet des hydrocarbures sur le végétal :	34
II-Discussion :	37
Conclusion générale :	41
Références bibliographiques :.....	43

Introduction générale

Introduction générale :

Les hydrocarbures pétroliers deviennent un problème mondial pour l'environnement, à cause de leur persistance (Hentati et *al.*, 2013). En Algérie, les hydrocarbures (HC) constituent le pivot essentiel de l'économie nationale (SONATRACH, 2010).

La pollution du sol par les HC est susceptible d'induire une bioaccumulation dans les chaînes alimentaires en présentant des risques significatifs pour la santé humaine, le végétal et l'animal. Elle est générée principalement par les stations-service (fuite des cuves de stockage, points de remplissage, îlots des pompes,...) qui sont une source importante et répandue dans l'espace (Colin, 2000). D'après l'agence de NAFTAL de la wilaya de Tizi-Ouzou (2018), il y a 86 stations-service ; celle de Boukhalfa étant considérée comme la plus consommatrice en HC essentiellement l'essence super et le gas-oil, dont les quantités distribuées par jour atteignent 7000 à 8000 l et 20000 à 21000 l respectivement.

La pollution dans ce cas est due au déversement des hydrocarbures lors du remplissage des cuves de la station et lors de la distribution des carburants. C'est une zone plus active, est malheureusement implantée autour de terres agricoles et à proximité d'un cours d'eau.

Afin d'éliminer ou de réduire cette pollution dans le sol, diverses techniques sont applicables. Les techniques physiques, chimiques ou thermiques sont les plus fréquemment utilisées. Elles sont très efficaces pour certains types de contaminants mais présentent l'inconvénient d'être onéreuses et de détériorer le sol. Actuellement, les méthodes biologiques suscitent beaucoup d'intérêt car elles sont économiques, respectueuses de l'environnement et sauvegardent les propriétés du sol (Girard, 2005 ; Koller, 2009). Parmi ces techniques figurent la biostimulation, qui consiste en une stimulation de l'activité des microorganismes indigènes par adjonction de nutriments (l'azote et le phosphore dans la plupart des cas), la phytoremédiation qui utilise des plantes pour extraire ou éliminer les polluants du sol et la bioaugmentation qui est l'inoculation du sol avec des souches bactériennes capables de dégrader les polluants. Ces techniques visent toutes à augmenter l'atténuation naturelle qui est l'aptitude du sol à s'auto-épurer grâce aux microorganismes indigènes.

Concernant la décontamination des sols pollués aux hydrocarbures, plusieurs travaux ont été effectués afin d'évaluer l'efficacité des techniques appliquées par la mesure des paramètres physico-chimiques et biologiques des sols.

Des études de phytoremédiation ont été réalisées à l'UMMTO (Ali Ahmed et Belkaid, 2006 ; Fezani et Khider, 2007 ; Kellas, 2008 ; Belkacem et Rouas, 2012 ; Alilouche et

Toudouft, 2014 ; Bourkache et Boussenou, 2015 ; Larabi et Moussi, 2016 ; Belhocine, 2016). D'autres études ont porté sur la biostimulation (Kahil et Issad) et sur la bioaugmentation (Alik et Belkacem, 2015). Tous ces travaux se sont basés essentiellement sur l'évaluation des paramètres physico-chimiques du sol et rarement sur la mesure des paramètres biologiques.

Actuellement, les études s'orientent plus vers la quantification des paramètres biologiques des sols, notamment l'activité enzymatique.

C'est dans cette optique que s'inscrit notre étude, axée sur l'évaluation de la qualité biologique du sol, l'objectif principal étant d'évaluer l'efficacité des techniques de dépollution d'un sol contaminé aux hydrocarbures (phytoremédiation, biostimulation et bioaugmentation) ainsi que l'atténuation naturelle de ce sol. Une comparaison entre les techniques appliquées est également envisagée.

Ce travail est subdivisé en trois chapitres. Le premier consiste en un rappel bibliographique sur la contamination du sol par les HC et les méthodes de décontamination. Le deuxième présente l'ensemble du matériel utilisé ainsi que les méthodes adoptées. Dans le troisième seront exposés les résultats obtenus au cours de notre expérience et leur discussion. Le document se termine par une conclusion générale et quelques perspectives.

Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-Contamination du sol par les hydrocarbures :

La pollution du sol par les hydrocarbures (HC) est due à des rejets, volontaires ou non, de produits pétroliers. Elle relève à la fois de la pollution chimique et de la pollution organique (Koller, 2009). Selon Colin (2000), la pollution par les hydrocarbures légers couramment commercialisés (essence, kérosène, gasoil, solvants) est très fréquente du fait de leur utilisation généralisée. Contrairement aux hydrocarbures lourds qui sont persistants. Leur présence dans le sol entraîne souvent une diminution de la perméabilité de celui-ci et une réduction de la circulation de l'eau au sein de la matrice.

I-1-Définition des hydrocarbures :

Les hydrocarbures sont des composés organiques formés exclusivement d'atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H), ils ont pour formule brute C_nH_m où « n » et « m » sont deux entiers naturels. Ce sont parmi les substances polluantes les plus dangereuses pour l'environnement (Lemière et *al.*, 2001).

Les hydrocarbures dérivés du pétrole sont la principale source d'énergie pour l'humanité (Romaniuk et *al.*, 2007). Ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts (Neff et *al.*, 1979). Ils peuvent être saturés (alcane) ou insaturés (alcène, alcyne), présentant une structure linéaire, ramifiée ou cyclique, ou des composés aromatiques qui présentent une structure cyclique (Syakti, 2004).

I-2-Sources des hydrocarbures :

Les hydrocarbures sont des polluants qui atteignent l'environnement de multiples sources : des sources naturelles et des sources anthropiques.

Sources naturelles: les feux de forêt et de prairie qui sont considérés comme les processus les plus importants qui génèrent des hydrocarbures. Mais, il existe d'autres processus tels que les éruptions volcaniques, l'érosion des roches, ainsi que la production d'hydrocarbures par les végétaux supérieurs (cires) ou par les algues (Jumeau, 1999).

Sources anthropiques: les activités des secteurs énergétiques (production d'hydrocarbures) et industriels (Pimsee, 2014).

I-3-Sources de pollution dans les stations-service :

Les stations-service se définissent comme l'ensemble des installations et des activités destinées à stocker et à transférer les hydrocarbures. L'exploitation de ce type d'activité représente une source potentielle de nuisances (trafic, bruit, pollution atmosphérique, pollution du sol et des eaux) pour le voisinage direct, mais aussi pour l'environnement en général. Les accidents se produisant dans les stations-service conduisent à des pollutions de sol ou de sous-sol (Patej, 2002). Ce phénomène se décline en deux catégories : d'un côté, la pollution accidentelle due au déversement d'HC lors du remplissage des stocks de la station, et l'autre côté lors de la distribution de carburant.

Le schéma ci-après montre les sources de pollution potentielle des sols dans une station-service (Carnicer, 2007).

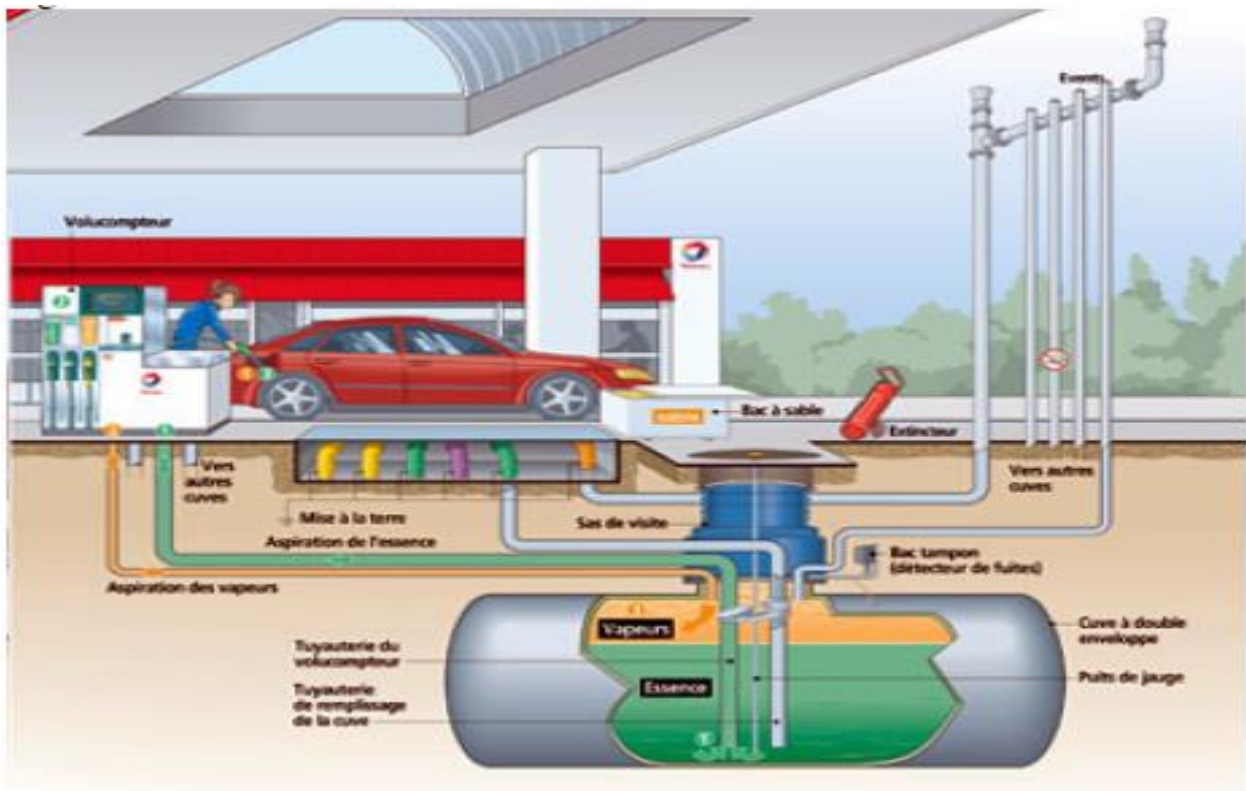


Fig. 1: Sources de pollution du sol dans une station-service (Carnicer, 2007).

Parmi les carburants stockés et vendus dans les stations-service figurent l'essence et le gas-oil, qui sont considérés comme des carburants légers dont les caractéristiques sont données dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques de l'essence et du gas-oil.

Essence	Gas-oil
- Mélange d'hydrocarbures, auxquels peuvent être ajouté des additifs.	- Mélange complexe, se compose principalement d'hydrocarbures aliphatiques (Nwinyi <i>et al.</i> , 2014).
- Contiennent environ 230 HC différents, $4 < n^{\text{bre}} \text{ d'atomes de C} < 10$.	- Contiennent 2000 à 4000 HC différents, $11 < n^{\text{bre}} \text{ d'atomes de C} < 25$.
- Distillation est effectuée à $30^\circ < T^\circ < 35^\circ$ et $180^\circ < T^\circ < 200^\circ$.	- Distillés à $180^\circ < T^\circ < 380^\circ$.
densité moyenne de 0.72 à 0.77 (Marchal <i>et al.</i> , 2003).	densité de 0.82 à 0.86.
- Composées de cinq classes principales d'hydrocarbures (Fig. 2a).	- Plus lourds que les essences, composés de produits moins volatiles (Saada <i>et al.</i> , 2005).
	- Composés de 3 classes d'hydrocarbures (Fig. 2b).

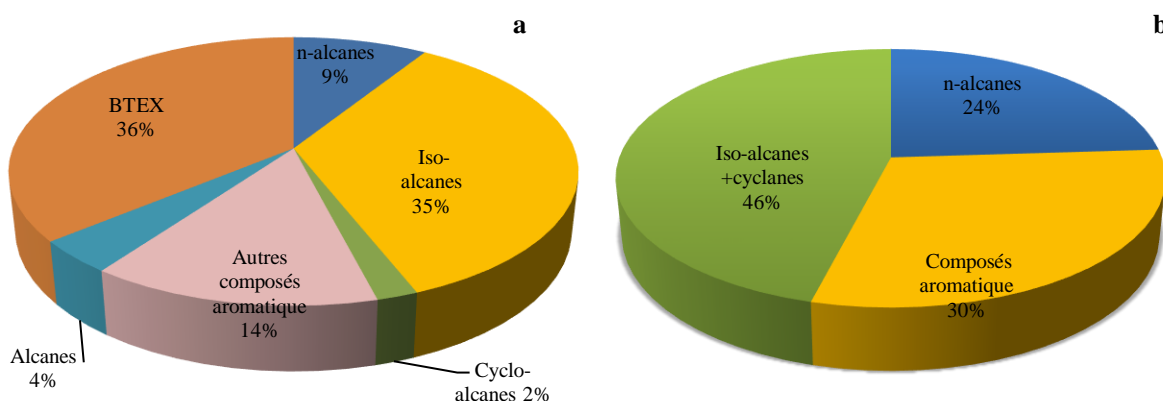


Fig. 2: Composition des carburants, essence (a) et gasoil (b) (Marchal *et al.*, 2003).

I-4-Comportement des hydrocarbures dans l'environnement :

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformé ou éliminé, après avoir été répandu dans l'environnement.

Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, nous citerons :

I-4-1-Volatilisation:

C'est un processus qui débute immédiatement après le déversement d'hydrocarbures et peut se poursuivre pendant quelques jours (Neff *et al.*, 2000). Elle touche les fractions de faible poids moléculaire (<12C) (Soltani, 2004).

I-4-2-Solubilisation :

Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible. Il est important de noter que ces HC solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore (Goswami et Singh, 1991 *in* Boudерhem, 2011; Bouchez *et al* ,1995 *in* Boudерhem, 2011).

I-4-3-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 µm) 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-4-4-Transformation abiotique :

C'est par des facteurs physiques et chimiques, que les HC se transforment.

I-4-4-1-Hydrolyse :

Processus de dégradation des molécules organiques sous l'action de l'eau, fortement influencé par le pH et la température du sol.

I-4-4-2-Photolyse :

C'est un phénomène d'oxydation des substances sous l'action de la lumière. Il n'a lieu qu'en surface dans les sols.

I-4-4-3- Les réactions d'oxydoréduction abiotique :

Elles sont catalysées par des constituants inorganiques divers. Les HC peuvent être dégradé par des réactions d'oxydoréductions. Ce mécanisme permet une nette diminution des HAP dans le sol (Laurent *et al* ., 2003).

I-4-5-Transformation biotique (la biodégradation) :

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Les microorganismes en sont responsables ; en particulier les bactéries (Soltani, 2004).

I-5-Effets des hydrocarbures :

Le type d'HC, la durée du contact, la quantité déposée et surtout le niveau de toxicité, influent sur l'importance de l'impact. Les HC légers sont plus toxiques que les HC lourds (Fattal, 2008).

La pollution par les hydrocarbures pose d'importants problèmes dans l'environnement vis-à-vis du sol, des microorganismes, des plantes, des animaux et de la santé humaine.

I-5-1-Effets sur les propriétés physico-chimiques du sol :

D'après Rouquerol et *al.* (1987), les HC enrobent les particules minérales du sol et assurent leur dispersion. Par ailleurs la présence des hydrocarbures dans le sol accroît son pouvoir de rétention en eau (Degranges et *al.*, 1977). Ils provoquent également une augmentation de la conductivité électrique (CE) entraînant l'inhibition de certaines plantes sensibles à la présence de sels, ainsi qu'une augmentation de la concentration des éléments à l'état de trace tels que le manganèse (Mn), le zinc (Zn) et le fer (Fe) dans le sol (Degranges et *al.*, 1977). Ils conduisent à une diminution du pH du sol et de la teneur en potassium, en calcium et en phosphore, et à une augmentation du taux de carbone organique total (Degranges et *al.*, 1977; Chaineau et *al.*, 1996).

I-5-2-Effets sur les propriétés biologiques :

I-5-2-1-Effet sur les microorganismes du sol :

L'imprégnation des sols en hydrocarbures a pour effet global une multiplication intense de la microflore en particulier des champignons, des bactéries et des levures (Rouquerol et *al.*, 1987).

D'après Demuysère (2011), la présence d'hydrocarbures dans les sols a un effet inhibiteur de la luminescence de bactéries. La souche bactérienne *Photobacterium phosphoreum* est inhibée par une contamination élevée d'hydrocarbures pétroliers (4.75 g. kg⁻¹ sol sec) ou d'une contamination de produits pétroliers bruts. Le suivi de la bioremédiation de ces sols contaminés a montré une diminution de la toxicité de sols contaminés sur les microorganismes.

I-5-2-2-Effets sur les plantes :

En général, les paramètres les plus suivis sont la germination des graines ou l'élongation des racines de plantes de différents types : laitue (*Lactuca sativa L.*), maïs (*Zea mays L.*), etc.

L'effet toxique des contaminants dans les sols est aussi parfois annulé, les plantes s'adaptant à leur nouvel environnement et/ou utilisent les contaminants comme source d'énergie (Demuysère, 2011). Les HC peuvent retarder considérablement la germination, et réduire le pourcentage de germination, la hauteur de la plante, la production de feuilles, la biomasse végétale, la surface foliaire, le ratio de la surface foliaire et le taux relatif de croissance (Njoku et *al.*, 2009).

L'application de traitements biologiques dans des sols contaminés aux hydrocarbures permet généralement d'améliorer la germination des graines. En effet, l'inhibition de cette dernière sera presque complètement annulée après application de traitements biologiques (Demuysère, 2011).

I-5-2-3-Effets sur la faune du sol :

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'animal ou lors de leur transfert dans la chaîne alimentaire. C'est un processus de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Soltani, 2004).

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 (gas-oil) augmente le stress pour les organismes vivants et la faune du sol tel que les vers de terre (Andreoni et *al.*, 2004 ; Alrumman et *al.*, 2015), les nématodes (*Rhabditis spp* et *Xiphinema spp*) et les arthropodes (Hamdi et *al.*, 2007). Contrairement aux collemboles et gastéropodes qui ont un fort caractère d'adaptation vis-à-vis des HC, ils sont souvent utilisés comme des bioindicateurs (Bachelier, 1978 ; Amireche, 2012).

I-5-2-4-Effets sur la biomasse microbienne :

Selon Rouquerol et *al.* (1987), la croissance de la biomasse microbienne est sensible aux pollutions aux HC : celle-ci est, en effet, inhibée en présence de fortes concentrations d'HC (diesel, gas-oil, pétrole brut, etc.). La biomasse diminue dans des sols moyennement ou fortement pollués par des HC. Il a également été observé une biomasse microbienne plus élevée dans des sols contaminés que dans les sols non contaminés (Dawson et *al.*, 2007).

Quant à l'ajout d'amendements organiques (fertilisants, nutriments, etc.), il tend généralement à stimuler la biomasse. Ainsi, la biomasse diminue suite à une contamination

aux HC, mais elle augmente de manière significative après l'application d'amendements organiques pour les traitements biologiques (Demuysère, 2011).

I-5-2-5-Effets sur la respiration microbienne :

Les effets des HC sur l'activité biologique du sol dépendent de leur nature, leur concentration dans le sol et d'autres facteurs liés au milieu (Duchaufour, 2001).

La respiration microbienne est plutôt stimulée par la présence d'hydrocarbures. Elle semble augmenter avec de faibles ou fortes concentrations de n'importe quels HC. Ceci peut s'expliquer par la résistance de certains microorganismes, responsables de la dégradation de ces composés, à la toxicité des hydrocarbures.

L'ajout d'amendements organiques et de fertilisants lors d'une bioremédiation augmente également la respiration microbienne que ce soit des contaminations aux HAP, diesel (Margesin *et al.*, 2000a ; Tejada *et al.*, 2008). Ceci peut s'expliquer par la stimulation de la croissance microbienne due aux substrats ajoutés lors des amendements organiques au sol (Tejada *et al.*, 2008). Cependant, la respiration microbienne n'est pas toujours significativement augmentée par les traitements biologiques dans des sols contaminés par des HC (Dawson *et al.*, 2007).

I-5-2-6-Effets sur l'activité enzymatique :

Il existe des enzymes qui sont parfois sensibles aux contaminations par les HC par exemple la catalase (Margesin *et al.*, 2000a ; Margesin et Schinner, 2001). Certains auteurs considèrent que l'activité enzymatique est un indicateur plus sensible que le suivi d'autres paramètres microbiens dans le cadre d'une contamination aux HC (Li *et al.*, 2007).

Une réduction de l'activité enzymatique dans des sols est le signe d'un effet toxique de la contamination aux HC sur les microorganismes. Généralement, l'impact des HC sur l'activité enzymatique dans les sols dépend de paramètres tels que les concentrations et la composition des HC, les propriétés des sols, ainsi que la durée d'exposition. En général, à la suite d'une contamination au diesel, les activités enzymatiques dans le sol ont tendance à diminuer (Demuysère, 2011).

Certaines études ont montré l'effet positif de l'amendement organique sur certaines propriétés et activités biologiques du sol : augmentation significative de la biomasse microbienne et des potentiels d'activités de quelques enzymes (Tejada *et al.*, 2008). Après

un traitement par bioremédiation de deux sols peu et moyennement contaminés aux HAP, les potentiels de certaines enzymes ont significativement augmenté (Demuysère, 2011).

II-Techniques de décontamination du sol pollué :

Les traitements de dépollution disponibles pour les sols pollués par les HC sont généralement plus nombreux, parmi eux : les techniques de traitement thermiques et physico-chimiques qui sont les plus répandues, mais elles sont coûteuses et écologiquement invasives, tandis que les procédés de traitement biologiques moins coûteuses et respectueuses de l'environnement (Khan et *al.*, 2013).

II-1-Atténuation naturelle :

C'est un processus se produisant naturellement dans les sols et les eaux souterraines sans intervention humaine. Elle vise à réduire la masse, la toxicité, la mobilité, le volume, ou la concentration de polluants. Les processus impliqués sont la dispersion, la dilution, la volatilisation, l'adsorption, les mécanismes (physiques, chimiques ou biologiques) de stabilisation ou de destruction des polluants (dégradation biotique par des bactéries autochtones ou abiotique) (ADEM, 2006).

C'est une biodégradation intrinsèque est proposé comme une pratique «rentable» optimale à faible risque (Romaniuk et *al.*, 2007).

II-2-Phytoremédiation :

II-2-1-Définition :

D'après Glick (2003), c'est une méthode de nettoyage qui offre une approche d'assainissement des HC plus rentable et plus respectueuse de l'environnement. Elle peut être définie comme l'utilisation de plantes pour enlever, détruire ou séquestrer les substances provenant de l'environnement.

La rhizoremédiation, un type spécifique de phytoremédiation, implique à la fois les plantes et leurs microbes associés de la rhizosphère. Ces microbes peuvent être des dégradeurs de contaminants et / ou peuvent favoriser la croissance dans des conditions de stress (Gerhardt, 2009).

Selon Duchaufour (1991), Les plantes sont sélectionnées selon leur taille et aptitude à faire plonger leurs racines profondément dans le sol, de manière à atteindre les couches polluées profondes, et selon le type de polluant qu'elles sont capables d'emprisonner. Les

plantes préconisées pour la phytoremédiation sont les légumineuses et les cultures fourragères pérennes.

II-2-2-Mécanismes de la phytoremediation :

Les végétaux peuvent agir par différents processus: la rhizofiltration, la phytoextraction et la phytostabilisation adaptées aux métaux lourds, la phytotransformation et la phytostimulation applicables aux polluants organiques (Fig. 3).

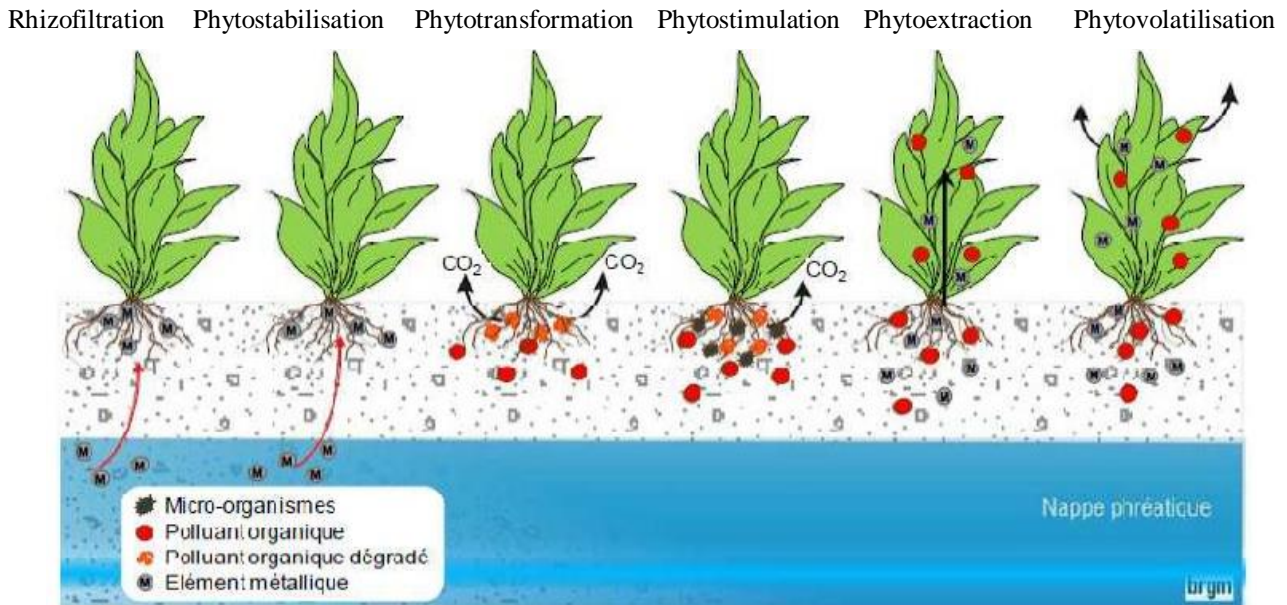


Fig. 3 : Récapitulatif de différents processus de phytoremédiation (Colombano et al., 2010).

II-2-1-1-Phytovolatilisation:

Cette technique utilise les plantes pour extraire les polluants puis les éliminer par évapotranspiration, via les stomates des feuilles ou les tiges, une fois volatilisé les polluants se dispersent dans l'atmosphère à des concentrations qui, normalement ne représente plus un danger pour l'homme (Vanobberghen, 2010). C'est une technologie attrayante parce que les polluants sont ainsi entièrement volatilisés (sous forme de gaz).

II-2-1-2-Phytostimulation :

La phytostimulation aussi nommée rhizodégradation consiste en la dégradation des contaminants qui sont présent dans la rhizosphère par l'activité microbienne, et qui est favorisée par la présence des plantes. Ces dernières peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et même biologiques de la rhizosphère par la sécrétion d'exsudats racinaires (Chevrier, 2013). Ces techniques sont adaptées à des sites présentant des pollutions à faible niveau de concentrations, mais sur de larges volumes. Elles sont considérées comme des

techniques de finition, une fois que des traitements plus énergiques sont réalisés pour la zone très polluée.

II-2-1-3-Phytoaccumulation (Phytoextraction) :

Selon Koller (2004), la phytoextraction utilise des plantes capables d'extraire, transporter et concentrer les polluants du sol dans les parties récoltables de la plante. Aussi, prélever les éléments traces toxiques et qui seront ensuite récoltées puis incinérées.

II-2-1-4-Phytostabilisation :

Il s'agit de l'utilisation des plantes pour réduire la biodisponibilité, la mobilisation, le lessivage des polluants, et par conséquent leur entrée dans la chaîne alimentaire ou les nappes phréatiques (Koller, 2004).

Cette technique est réalisée par l'absorption ou l'adsorption des polluants par les racines de la plante, ou par réduction de l'érosion du sol ou de la poussière soulevée par le vent. C'est une méthode efficace pour empêcher la dispersion des métaux biodégradable dans les eaux de surface (West et Bridget, 2001).

II-2-1-5-Rhizofiltration :

C'est l'utilisation des racines des plantes pour absorber (l'absorption au niveau des racines), concentrer, ou précipiter les polluants d'un effluent liquide (Koller, 2004). Cette technologie est généralement utilisée afin de traiter les sites contaminés aux métaux lourds et radionucléaires comme le plomb, le zinc, le cuivre, nickel...

II-3-Biostimulation :

Le processus de biostimulation introduit des nutriments supplémentaires dans un système pollué afin d'augmenter le nombre de micro-organismes indigènes. Lorsqu'une zone est contaminée par des HC, les réserves disponibles de nutriments inorganiques majeurs, tels que l'azote(N) et le phosphore (P), s'épuise rapidement. Par conséquent, la supplémentations en éléments nutritifs pour la dégradation des hydrocarbures a traditionnellement porté sur l'ajout d'azote et de phosphore, sous leurs formes organiques ou inorganiques (Silva-Castro, 2013).

Elle permet d'augmenter et d'accroître la biomasse et/ou de stimuler l'activité métabolique visée des microorganismes indigènes d'intérêt (Huguenot, 2010).

II-4-Bioaugmentation :

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes d'intérêt à la surface du milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter et d'améliorer la dégradation des composés organiques indésirables. Généralement, les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes. Des éléments nutritifs sont généralement apportés dans la solution contenant les microorganismes. Cette suspension de microorganisme est apportée à la surface du sol dans les conditions naturelles ou injectés dans le site contaminé sous pression (Abdelly, 2007).

Elle est largement utilisée pour décontaminer les sites contenant des HC.

II-5-Autres techniques de dépollution :

Il existe d'autres techniques biologiques pour décontaminer les sols pollués (tableau 2).

Tableau 2: Autres techniques de bioremédiation

Bioventing	Stimulation de la dégradation des polluants par les microorganismes dans les zones insaturées par apport d'oxygène (Colombano et al ., 2010).
Biosparging	Stimulation de la biodégradation dans la zone saturée et la zone capillaire par apport d'oxygène (Colombano et al ., 2010).
Landfarming (traitement par épandage)	Basé sur l'ajout de compost au sol pour favoriser la biodégradation des polluants et pour encourager la croissance des populations de microorganismes dans un sol contaminé. Employé avec succès pour enlever les grandes flaques de pétrole dans le sol (Oultaf, 2015).
Compostage	Mélanger des terres contaminées avec un compost adapté afin de favoriser la dégradation des contaminants. C'est la transformation et valorisation des matières organiques (MO) (sous-produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique) en compost (Abdely, 2006).

III-Evaluation de l'efficacité de techniques de dépollution du sol (qualité biologique des sols) :

Pour évaluer la capacité d'un sol à fonctionner en continu dans le temps comme un système dynamique et vivant, il existe des indicateurs de qualité des sols de type «physique» (texture, densité, etc.) et « chimique » (MO, pH, C, N, P, etc.) (Doran et Safley, 1997), ainsi que des indicateurs de type « biologique » (activité biologique, biomasse microbienne, activité enzymatique, germination et élongation racinaires), qui sont plus dynamiques et sujets au changement à court terme, et par conséquent plus aptes à interpréter la qualité d'un sol (Bastida et *al.*, 2008).

La biomasse microbienne fait référence à la fraction vivante de la matière organique. Elle permet d'estimer la flore viable du sol. D'après Gil-Sotres et *al.* (2005), elle est définie comme un indicateur de qualité d'un sol. La biomasse microbienne est une source de nutriments qui supporte beaucoup de fonctions, elle est impliquée dans les cycles de transformation des éléments (C, N, P, S) (Nannipieri et *al.*, 2002). C'est un indicateur de suivi du carbone organique dans les sols (Carter et *al.* , 1999) et de changement dans la gestion du sol (Knight et Dick, 2004). Alors que l'activité biologique est caractérisée par la présence de CO₂.

Les activités enzymatiques sont des catalyseurs biologiques pour des réactions microbiennes dans le sol, les enzymes sont des indicateurs de contrôle de la libération des nutriments pour la croissance des plantes et des microorganismes (Burns, 1978). Les activités les plus étudiées sont la déshydrogénase qui fournit une indication globale de l'activité de diverses communautés microbiennes (Liu et *al.*, 2014)), la catalase qui est une enzyme extracellulaire, capable de transformer les phénols par exemple. Elle est souvent utilisée comme mesure de la sévérité du stress oxydatif causé par les HAP, la peroxydase qui est un capteur de radicaux libres qui utilise le peroxyde d'hydrogène comme substrat pendant la réticulation des mono- et dilignols. Elle peut être induite sous le stress des HAP pour s'adapter à la biosynthèse de la lignine et à d'autres voies de réponse au stress, la polyphénoloxydase qui est l'une des oxydoréductases les plus importantes du sol et elle intervient dans la conversion des composés organiques aromatiques en fractions humiques (Liu et *al.*, 2014). Elle est déterminée par le degré de pollution par le pétrole brut (Dindar et *al.*, 2017).

Le test de germination est un paramètre qui vise à examiner la toxicité d'une pollution sur la germination des graines.

Chapitre II: Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

Afin d'évaluer l'efficacité de quelques techniques biologiques (phytoremédiation, biostimulation et bioaugmentation) dans la décontamination d'un sol pollué aux carburants (essence super et gas-oil), des tests biologiques ont été réalisés. Les sols traités sont comparés à un sol qui n'a pas été traité (atténuation naturelle). Ce travail a été mené au laboratoire de "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-Sol:

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé un échantillon de sol pollué provenant de la station-service de Boukhalfa qui se situe 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.

Ce sol limono-argileux contaminé (par des déversements accidentels d'essence super et de gas-oil lors du remplissage des réservoirs de stockage) prélevé dans la couche superficielle (0-15cm) et dont les caractéristiques sont consignées dans le tableau 3, a été réparti en quatre lots, trois d'entre eux ont été traités chacun avec une technique biologique différente (bioaugmentation par l'utilisation d'une suspension de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, biostimulation par l'ajout de phosphate monopotassique (KH₂PO₄) et de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄, phytoremédiation par la culture de la fève. Le quatrième lot n'a subi aucun traitement (atténuation naturelle). Ces sols étaient conservés au réfrigérateur à 4°C.

Tableau 1 : Caractéristiques du sol provenant de la station-service (Bourkache et *al.*, 2015).

Caractéristiques	Résultats
pH	7.2
CE	0.74 mmhos/cm
C _{org}	8.84%
N _{tot}	0.3%
P(P ₂ O ₅)	5.45 mg P ₂ O ₅ /Kg du sol

I-2-Matériel végétal :

Pour évaluer la toxicité résiduelle des hydrocarbures vis-à-vis des plantes, notre choix s'est porté sur le maïs et la laitue ; deux espèces sensibles aux hydrocarbures. Ces espèces sont souvent utilisées dans les tests écotoxicologiques.

I-2-1-Maïs (*Zea mays*) :

Le maïs est une plante tropicale herbacée annuelle de la famille des Poacées (Graminées), largement cultivée comme céréale. Le maïs possède un système racinaire de type fasciculé. D'après Chaineau et *al.* (1996), le maïs est considéré comme une espèce sensible à la pollution par les HC.

I-2-2-Laitue (*Lactuca sativa*) :

C'est une plante annuelle, de la famille des Astéracées (Priaç, 2014). Elle est considérée comme une espèce sensible à la pollution par les HC, dont Chaineau et *al.* (1997) ; Vioko et Fashemi (2005) ont montré la diminution du nombre de graines germées suite à la contamination par ces polluants.

II-Méthodes :

II-1-Indicateurs biologiques de la qualité du sol :

II-1-1- Activité biologique globale:

L'activité biologique globale a été décrite par Dommerges (1968). Elle a été évaluée par le test respirométrique.

Dans des flacons de 250 ml, bien fermés, contenant 100 g de chaque sol, 2 tubes à hémolyse ont été placés l'un contenant de l'eau pour éviter le dessèchement du sol et l'autre 5 ml de NaOH à 0.5N pour fixer le CO₂ dégagé par les microorganismes. Pour chaque sol, 3 répétitions ont été réalisées. Les sols ont été ensuite incubés pendant 7 jours à 28°C.

Après incubation, le NaOH contenu dans les tubes est titré par l'acide sulfurique dilué (H₂SO₄) à 0.25N, en ajoutant une goutte de phénophtaléine. La fin de la titration est marquée par la disparition de la couleur rose violacé (Fig.4).

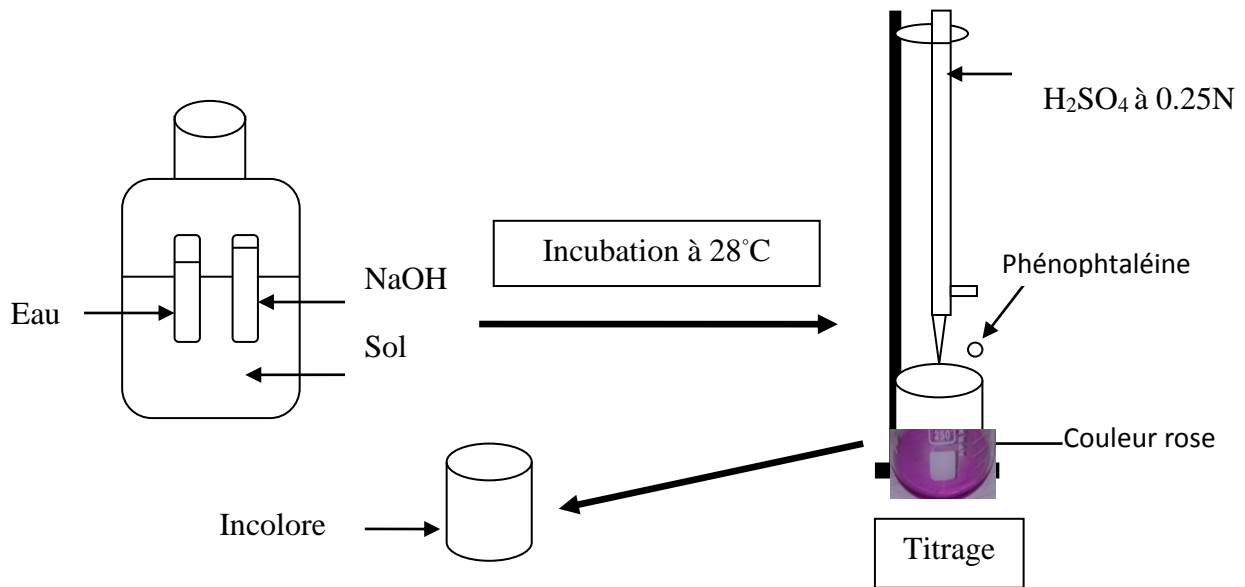


Fig. 1 : Protocole de mesure de la respiration microbienne (Originale, 2018).

Le taux de minéralisation du carbone est ensuite calculé en divisant la quantité de carbone du CO₂ sur la quantité de carbone organique, après avoir mesuré le carbone organique total dans les quatre sols par la méthode Anne (1945) avec une prise d'essai de 1g.

II-1-2- Biomasse microbienne :

La biomasse microbienne est la fraction labile et active de la matière organique du sol. Elle a été déterminée par la méthode de fumigation-extraction proposée par Jenkinson et Powlson (1976) et adaptée par Chaussod et Nicolardot (1982).

Nous avons pesé 4 g de chaque sol que nous avons placé dans des boîtes de Pétri puis fumigé par des vapeurs de chloroforme pendant 24 heures à 20°C dans un dessiccateur. L'extraction du carbone labile est faite par agitation de 45 mn dans 20 ml de K₂S₀₄ à 0,05 N (rapport sol/solution = 1/5). La suspension est ensuite centrifugée pendant 15 mn à 4500 tours/mn. Le surnageant est récupéré et est séché dans une étuve à 50°C pendant 24h. D'autres échantillons n'ont pas été exposés aux vapeurs de chloroforme (non fumigés) (Fig.5).

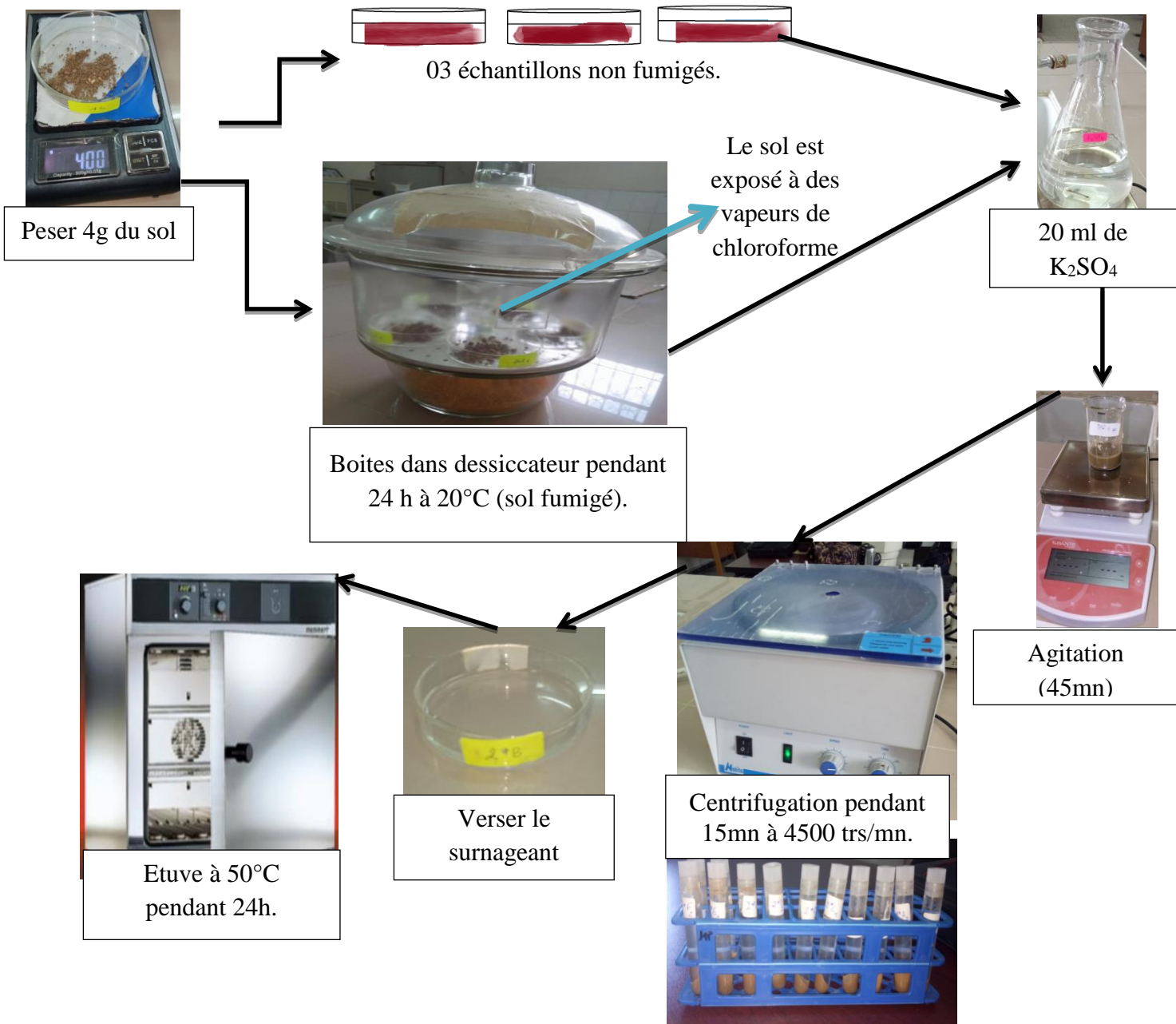


Fig. 2 : Protocole de la technique fumigation-extraction (Originale, 2018).

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 CO₂ 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. 5). (Fig. 6).

Détermination du carbone de la biomasse microbienne :

Le carbone extractible microbien est égal au supplément de carbone extrait dans les échantillons fumigés par rapport aux échantillons non fumigés par le chloroforme.

$$Bc = (CF - CNF) / Kec$$

Bc : Carbone de la biomasse microbienne.

CF : Carbone de filtrat K₂SO₄ de sol fumigé.

CNF : Carbone de filtrat K₂SO₄ de sol non fumigé.

Kec: Coefficient d'efficacité d'extraction du carbone de la biomasse microbienne (Kec=0.38).

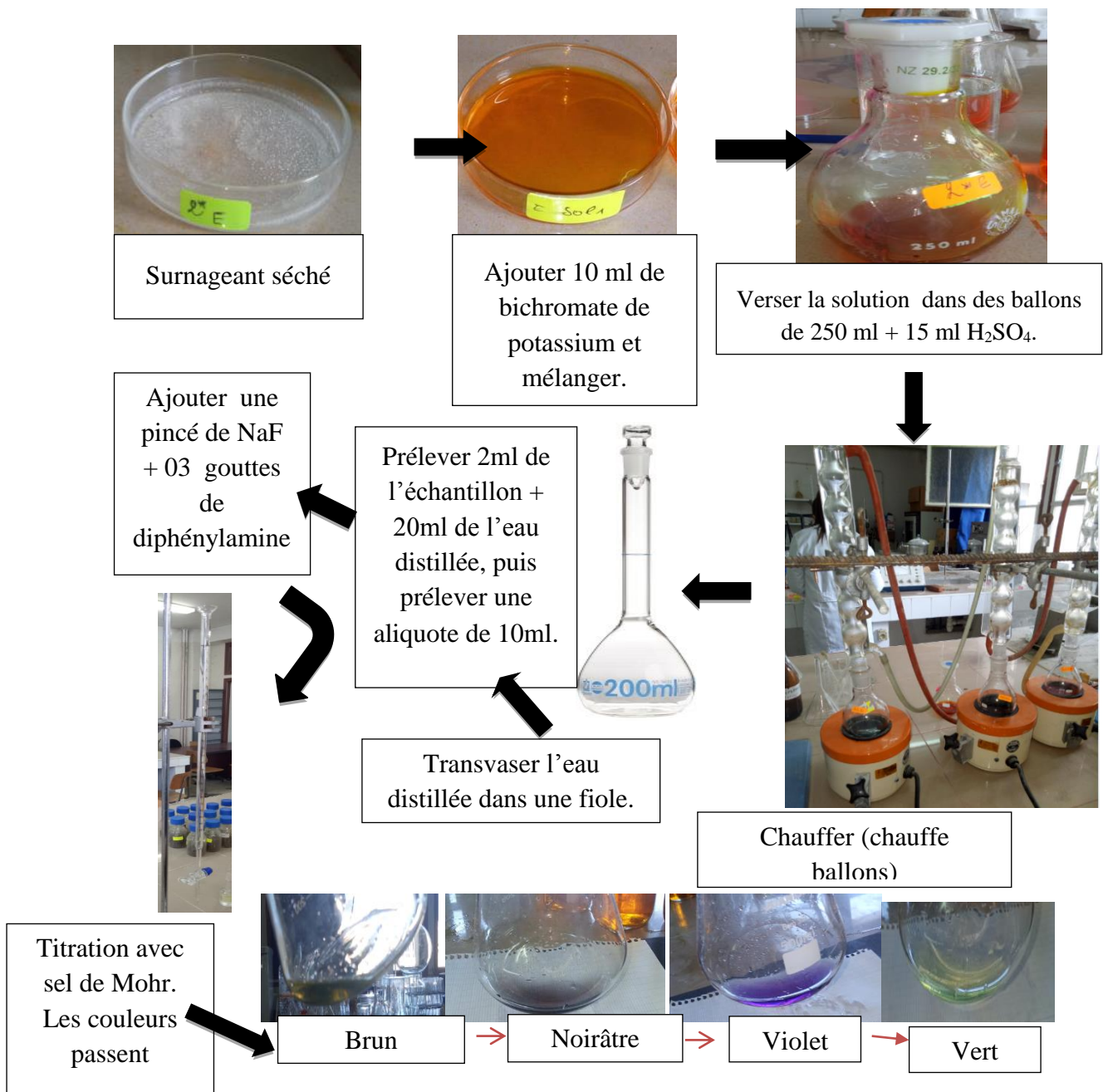


Fig. 3: Protocole de dosage du carbone organique (Originale, 2018).

II-1-3- Activités enzymatiques :

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

II-1-3-1-Activité de la catalase (CAT) :

Ajouter 2,5 ml de H_2O_2 à 0,3% et 20 ml de tampon phosphate (pH 7) à un échantillon de sol (5 g), et le mélange réactionnel a été incubé à 25 ° C pendant 20 mn.

Après l'incubation, ajouter 2,5 ml de $3 \text{ mol.l}^{-1} H_2SO_4$ à la solution pour arrêter la réaction, suivi du filtrage du mélange en le faisant passer à travers un papier filtre.

Titrer 15 ml du filtrat par $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$ de solution de $KMnO_4$ jusqu'au virement de couleur rose claire. Enfin, le volume dissipatif de la solution de $KMnO_4$ a été utilisé pour désigner l'activité CAT .Toutes les activités enzymatiques ont été mesurées en double pour tous les sols (Fig. 7).

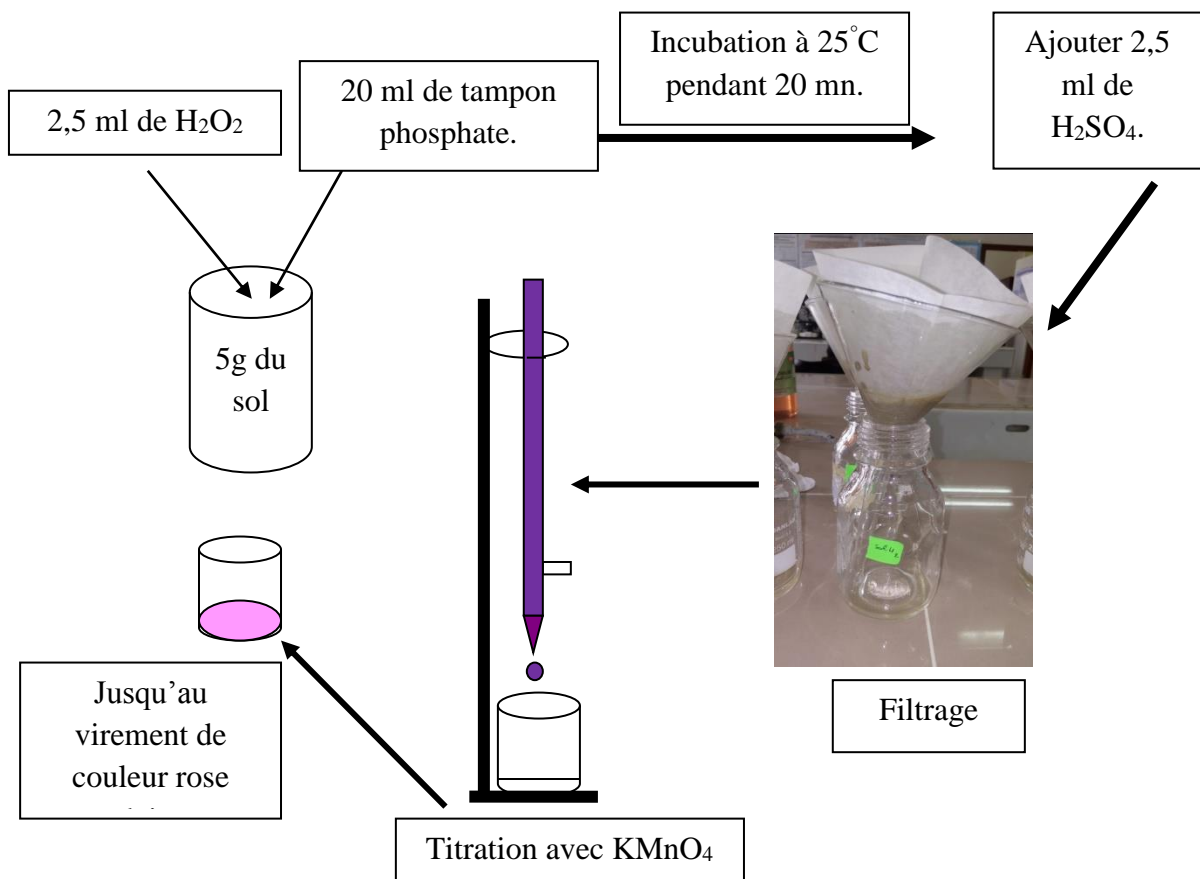


Fig. 4: Protocole de l'activité de CAT (Originale, 2018).

II-1-3-2-Activité de polyphénoloxydase (PPO) :

Peser 1 g de sol dans un bécher, ajouter 10 ml de pyrogallol à 1,0%. 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 pourpre dissoute a été mesuré par spectrophotométrie (Shimadzu UV-1280) à une longueur d'onde de 430 nm. Des dosages sans sol et sans pyrogallol ont été effectués en même temps (Fig. 8).

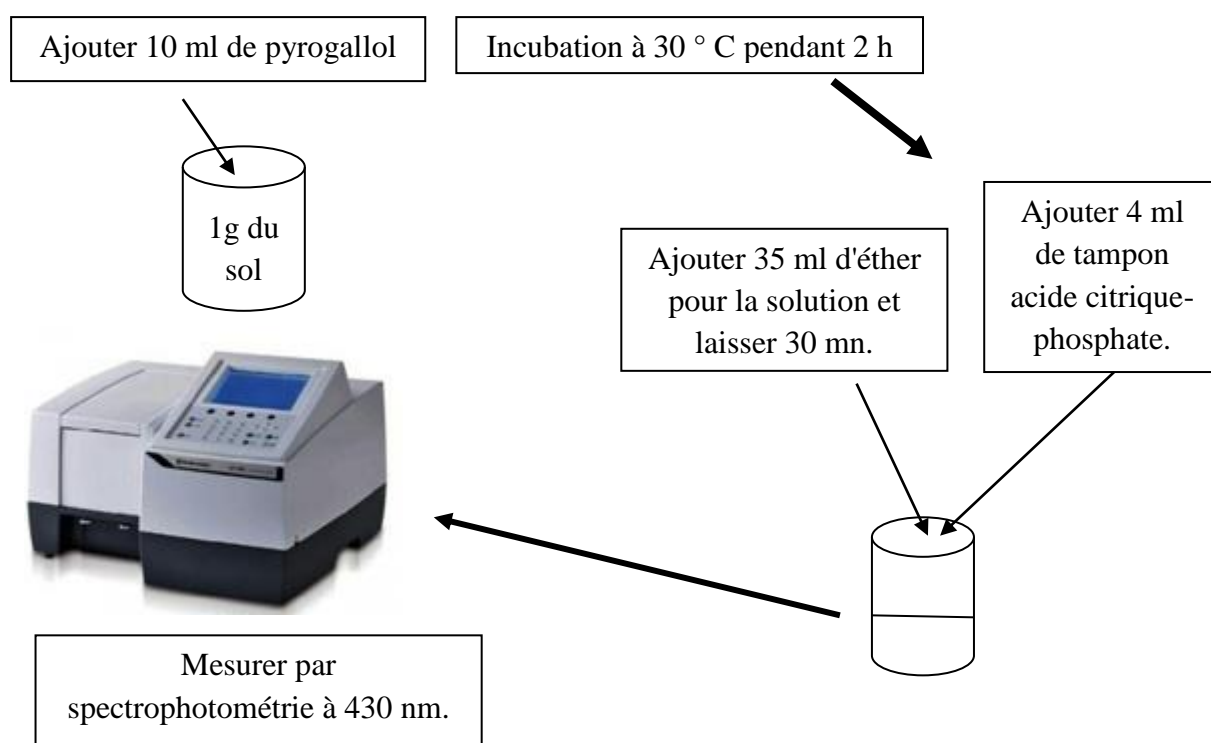


Fig. 5 : Protocole de l'activité de PPO (Originale, 2018).

II-1-3-3-Activité de peroxydase (POD) :

Peser 1 g de sol dans un bécher, puis ajouter 10 ml de pyrogallol à 1,0% et 2 ml de H₂O₂ 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 ont été réalisés en même temps (Fig. 9).

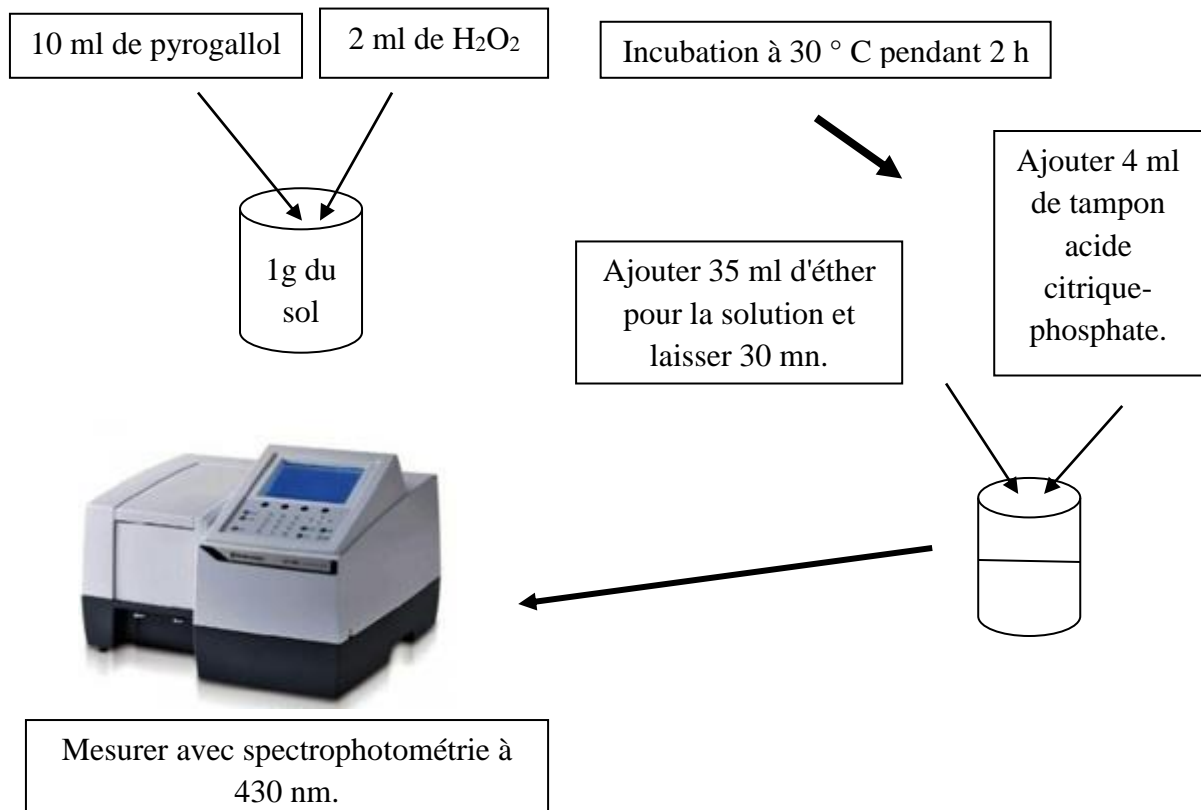


Fig. 6 : Protocole de l'activité de POD (Originale, 2018).

II-1-3-4-Activité de 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 CaCO₃ et 0,5 ml de TTC à 3%. Le mélange a été incubé à 37 ° C dans l'obscurité pendant 24 h.

Après l'incubation, ajouter 5 ml de méthanol pour chaque échantillon et agiter 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 adsorbant 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 adsorbant dans les entonnoirs. Les échantillons ont ensuite

été mesurés par spectrophotométrie à 485 nm après avoir été dilués à 50 ml en utilisant du méthanol. Des dosages sans CaCO_3 et sans TTC ont été effectués en même temps (Fig. 10).

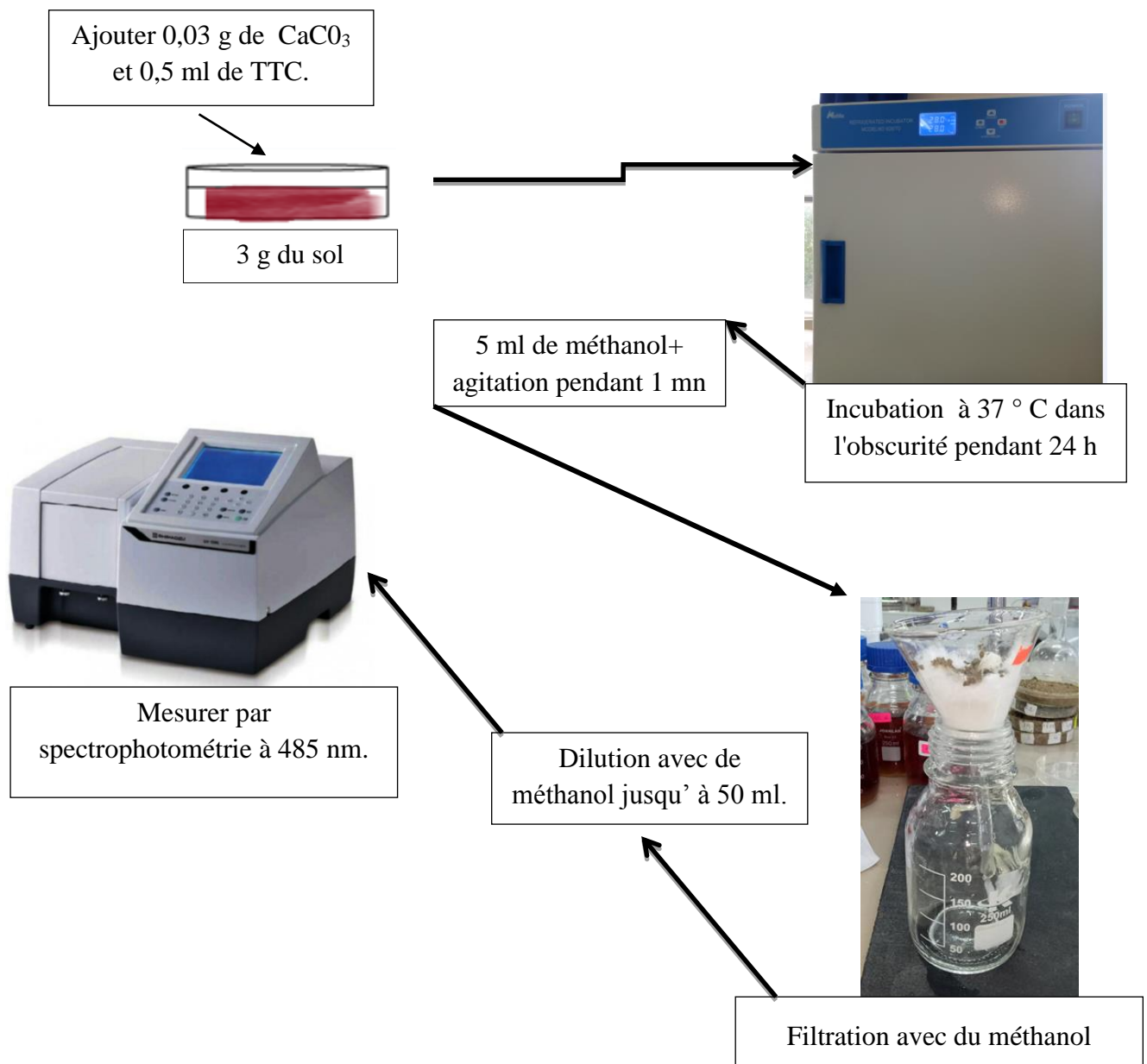


Fig. 7 : Protocole de l'activité de DHO (Originale, 2018).

II-2-Analyse des hydrocarbures:

II-2-1-Evaluation de la quantité des HCT dans le sol :

L'évaluation s'effectue par l'extraction des HCT contenus. Le but de cette extraction est d'évaluer la quantité des HC restants dans le sol après traitements par les différentes techniques.

Nous avons pesé 20 g de chaque sol, auxquels nous avons ajouté 100 ml d'hexane que nous avons laissé en agitation pendant 6 h. L'étape de séparation est réalisée par centrifugation à 4500 tours/mn pendant 20 mn. Le surnageant a été récupéré et laissé jusqu'à évaporation totale du solvant. Après évaporation, nous avons pesé les quantités d'HC extraites à l'aide d'une balance. 3 répétitions ont été effectuées pour chaque sol (Fig. 11).

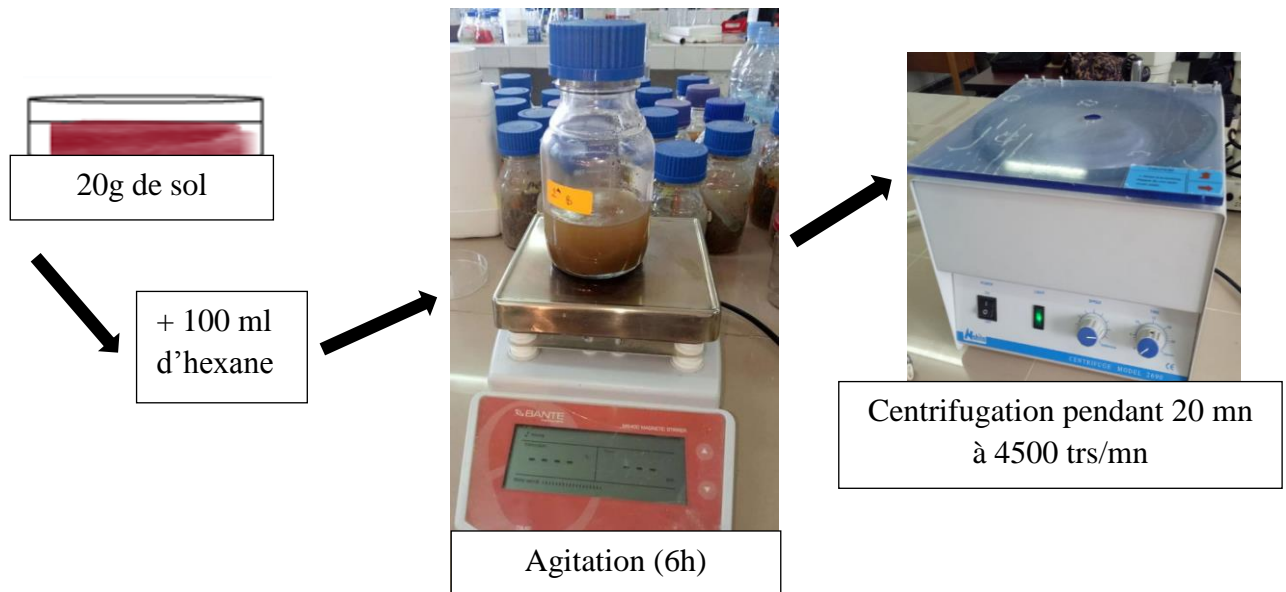


Fig. 8 : Protocole de l'extraction des hydrocarbures résiduels (Originale, 2018).

II-2-2-Analyse qualitative des HC :

Les hydrocarbures extraits dans l'hexane comme décrit ci-dessous ont été analysés par spectroscopie UV par un spectrophotomètre Shimadzu–UV-visible-1280 afin de déterminer leur composition.

II-3-Test d'écotoxicité :

II-3-1-Test de germination :

Dans une boîte de Pétri, 20 graines de maïs de même poids (0.215 ± 0.005 g) ont été semées sur 100 g de sol et recouvert avec du sable lavé, séché et tamisé (1mm) au préalable. Le test a été réalisé aussi avec 20 graines de laitue de même poids (entre 0.0010 et 0.0011g).

Les boîtes sont mises dans un incubateur à 20°C pendant une semaine ; à l'obscurité les 4 premiers jours puis soumises à une photopériode pendant les 3 jours restants. Le sol était arrosé régulièrement.

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

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

II-3-2-Elongation racinaire :

Après le dénombrement de graines germées, nous avons choisi les plantules présentant les racines les plus longues dont nous avons mesuré la longueur. Ces plantules ont été ensuite remises dans le sol qui est arrosé puis ré-incubé à 20°C. Après une semaine, nous avons mesuré à nouveau la longueur des racines.

L'élongation racinaire se calcule de la façon suivante :

$$\text{Elongation racinaire} = 2^{\text{ème}} \text{ mesure} - 1^{\text{ère}} \text{ mesure.}$$

III-Analyse statistique des données :

L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée avec le logiciel R 3.0.2. La différence est considérée significative à $p < 0.05$.

Les résultats ont été soumis au test de l'anova à un facteur suivie du test de Newman et Keuls pour établir les groupes homogènes dans le cas où les différences sont significatives. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé lorsque la normalité n'est pas vérifiée, suivi du classement des moyennes des rangs.

Chapitre III :

Résultats et

discussion

Chapitre III : Résultats et discussion.

I-Résultats :

Notre étude a consisté en l'évaluation de l'efficacité de quelques techniques biologiques de décontamination (biostimulation, bioaugmentation et phytoremédiation) d'un sol pollué par les hydrocarbures par comparaison à l'atténuation naturelle.

I-1-Effet des hydrocarbures sur les paramètres biologiques du sol :

I-1-1-Résultats du test respirométrique:

La respiration du sol correspond à la production de dioxyde de carbone résultant de l'activité biologique du sol par les organismes vivants. Elle permet une estimation de la quantité de matière organique minéralisée par les microorganismes du sol.

L'effet de la décontamination du sol sur la respiration microbienne est illustré par la figure 12.

Les résultats montrent que la production cumulée de CO₂ dans le sol soumis à l'atténuation naturelle est 1,3 ; 1,5 et 1,6 fois plus élevée que dans les sols ayant été traités par bioaugmentation, biostimulation et phytoremédiation respectivement.

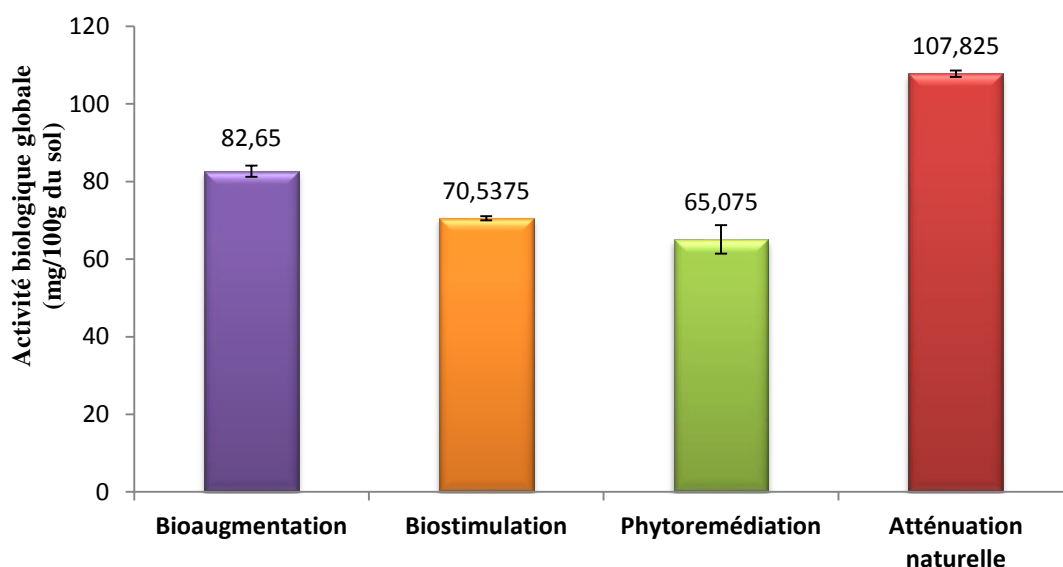


Fig. 1: Production de CO₂ cumulée.

Le test de l'anova à un facteur pour la production cumulée de CO₂ (Annexe II), montre qu'il y a une différence très hautement significative entre les différents traitements

(p-value = 2,901e-05). , ce qui signifie que ces traitements n'ont pas agi de la même façon dans la décontamination du sol.

Le test de Newman et Keuls (Annexe III) a classé les traitements en 3 groupes homogènes. L'atténuation naturelle est classé dans le groupe « a », la bioaugmentation dans le groupe « b », la biostimulation et la phytoremédiation dans le groupe « c », cela indique que la biostimulation et la phytoremédiation ont la même efficacité dans la décontamination 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 13 montrent que l'atténuation naturelle a abouti à un taux de minéralisation 1,3 ; 1,5 et 1,6 fois plus élevé dans les sols traités par bioaugmentation, biostimulation et phytoremédiation respectivement.

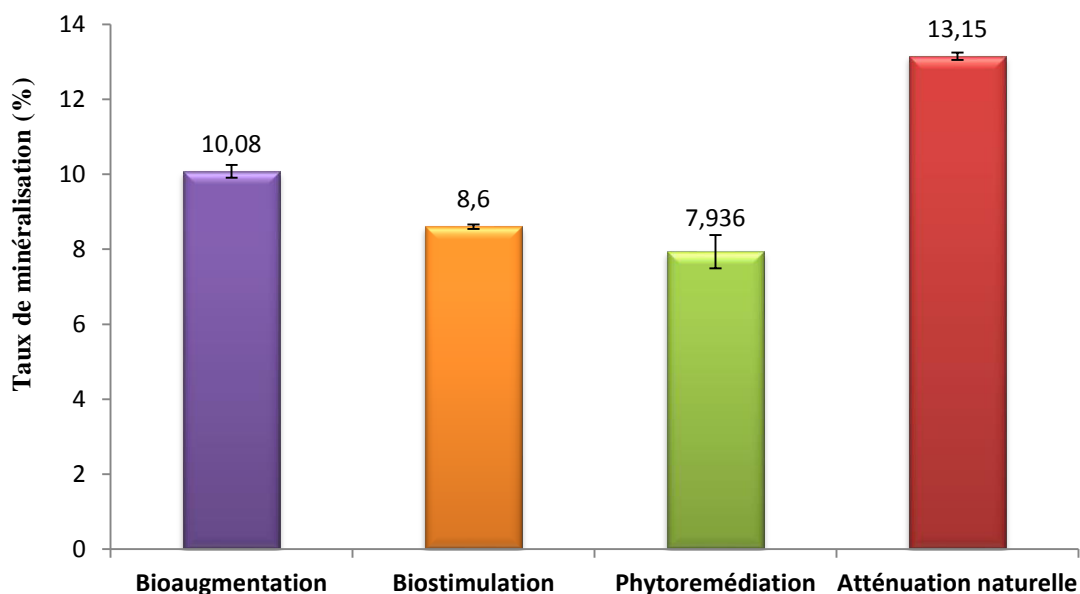


Fig. 2 : Taux de minéralisation du carbone induits par les différents traitements du sol.

D'après le test de l'anova à un facteur (Annexe IV), le taux de minéralisation a révélé une différence très hautement significative (p-value=2,901e-05).

Le test de Newman et Keuls (Annexe V) a classé les traitements en 3 groupes homogènes. L'atténuation naturelle est classée dans le groupe « a », la bioaugmentation dans

le groupe « b », la biostimulation et la phytoremédiation dans le groupe « c », cela indique que le taux de minéralisation était le même après biostimulation et après phytoremédiation. Ces deux techniques ont eu la même efficacité dans la décontamination du sol.

I-1-3-Biomasse microbienne :

La biomasse microbienne correspond à la quantité de microorganismes vivants présents dans le sol. La figure 14 montre la biomasse microbienne enregistrée dans sols ayant subi les différents traitements. Il en ressort que l'atténuation naturelle a engendré une biomasse microbienne 1,3 fois la biomasse enregistrée dans le sol bioaugmenté, 2,6 fois plus élevée que dans le sol traité par biostimulation et 4 fois plus importante que dans le sol traité par phytoremédiation.

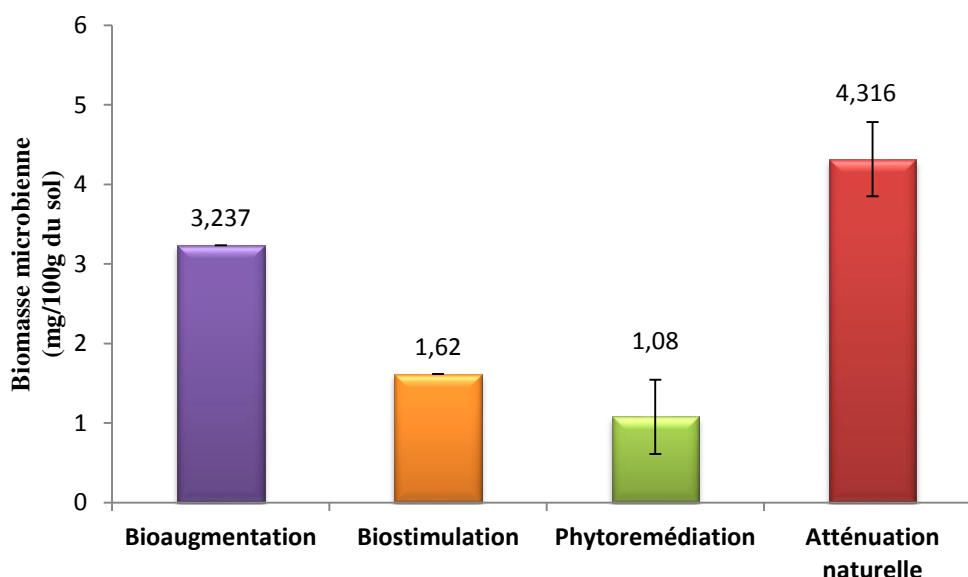


Fig. 3 : Biomasse microbienne dans les différents traitements du sol.

L'anova à un facteur (Annexe VI) a fait ressortir un effet très hautement significatif du traitement sur la biomasse microbienne ($p\text{-value}=0.0009178$). D'après le test de Newman et Keuls (Annexe VII), les traitements sont classés dans 3 groupes homogènes. L'atténuation naturelle est classée dans le groupe « a », la bioaugmentation dans le groupe « b », tandis que la phytoremédiation et la biostimulation appartiennent au groupe « c », ceci montre, encore une fois que la phytoremédiation et la biostimulation ont eu le même effet dans la décontamination du sol.

I-1-4-Activité enzymatique :

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzymes actives dans le sol.

I-1-4-1-Activité de la CAT :

La transformation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau peut être favorisée par la CAT. La figure 15 représente l'activité de catalase dans les différents traitements, exprimée par la quantité de H₂O₂ (en moles) ayant été transformée.

D'après les résultats de la figure 16, nous avons observé que les valeurs de l'activité de la catalase ont été proches les unes des autres.

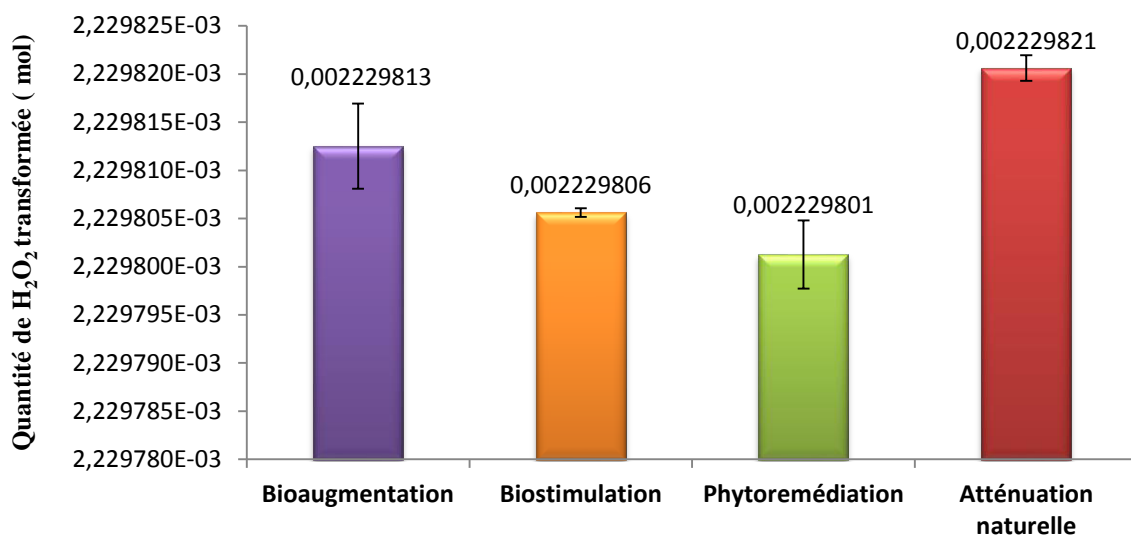


Fig. 4 : Activité de la catalase dans les différents traitements.

L'anova à un facteur (Annexe VIII) a révélé qu'il n'y avait pas de différence significative entre les traitements (p-value=0.099).

I-1-4-2-Activité de la PPO :

La polyphénoloxydase intervient dans la conversion des composés organiques en fractions humiques. L'activité de la polyphénoloxydase dans les différents sols, exprimée par la valeur de l'absorbance, est représentée par la figure 16. L'activité mesurée dans le sol non traité est proche de celle enregistrée dans le sol traité par bioaugmentation et celui traité par biostimulation. Dans le sol phytoremédié, l'activité de la PPO était égale à environ 1/5^{ème} de celle du sol non traité.

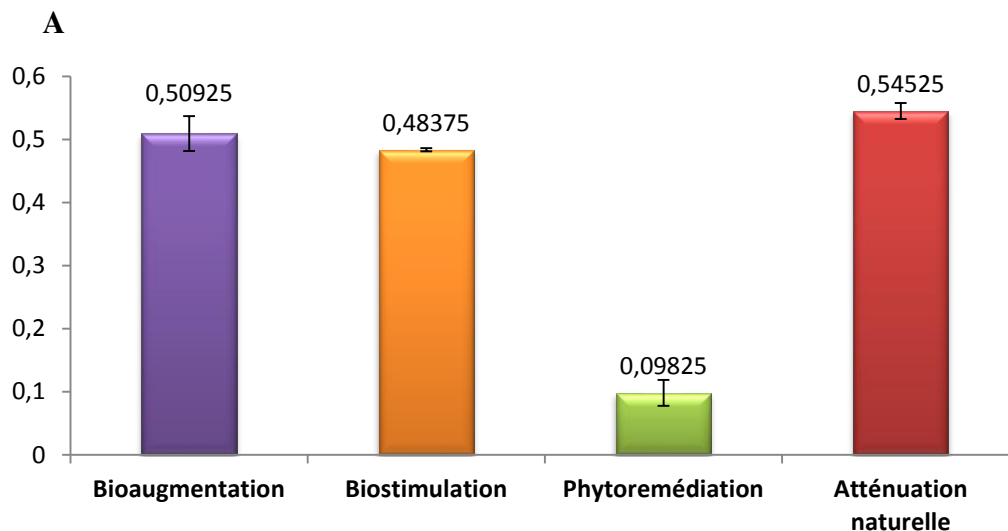


Fig. 5: Activité de polyphénoloxydase (PPO).

Le test de l'anova à un facteur (Annexe IX) a fait ressortir un effet très hautement significatif des différents traitements sur l'activité de la polyphénoloxydase (p-value=0.00076).

Le test de Newman et Keuls (Annexe X) a fait ressortir 2 groupes homogènes. L'atténuation naturelle, la bioaugmentation et la biostimulation sont classées dans le groupe « a », alors que la phytoremédiation appartient au groupe « b ». Cela indique que l'atténuation naturelle, la bioaugmentation et la biostimulation ont agi de la même façon sur l'activité de la PPO.

I-1-4-3-Activité de la POD :

Les peroxydases sont capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques. L'activité de la peroxydase dans les sols traités différemment est représentée dans la figure 17.

Selon les résultats obtenus, l'activité de la POD était quasiment identique dans le sol non traité et celui traité par bioaugmentation. L'activité de cette enzyme était plus faible dans le sol traité par biostimulation suivi du sol traité par phytoremédiation.

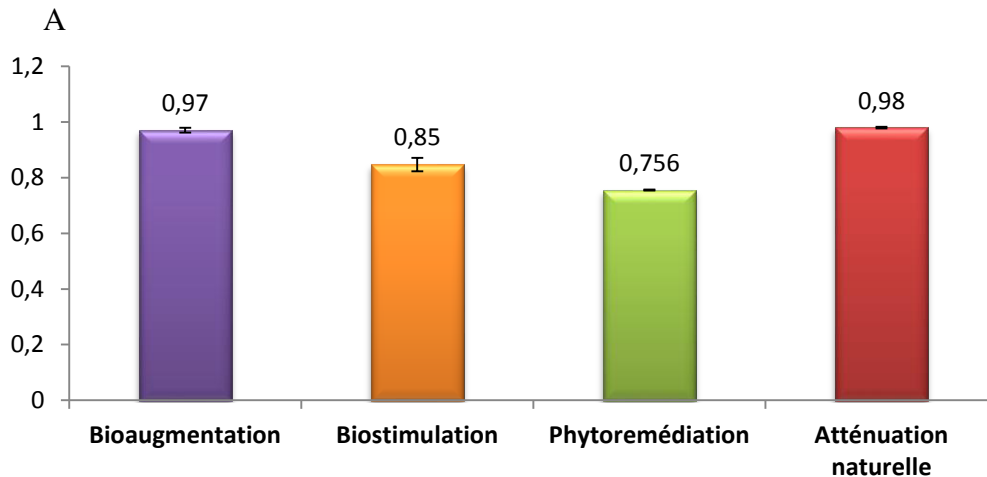


Fig. 6 : Activité de peroxydase (POD) dans les sols traités différemment.

L'anova (Annexe XI) a révélé qu'il y a une différence hautement significative (p -value=0.00259). Les traitements n'ont pas eu la même influence sur l'activité de la POD.

Le test de Newman et Keuls (Annexe XII) a donné trois groupes homogènes. L'atténuation naturelle et la bioaugmentation sont classées dans le groupe « a », la biostimulation dans le groupe « b » et la phytoremédiation dans le groupe « c ».

I-1-4-4-L'activité de la DHO :

L'activité de la déshydrogénase est une mesure de la capacité d'oxydoréduction de la biomasse microbienne du sol.

Le graphe de la figure 18 représente l'activité de déshydrogénase dans les différents traitements. La valeur de la DHO dans le sol non traité (atténuation naturelle) est plus élevée que celles enregistrées dans les sols traités avec une activité 3 ; 5,5 et 2,7 fois plus importante que celle observée dans les sols traités par bioaugmentation, biostimulation et phytoremédiation.

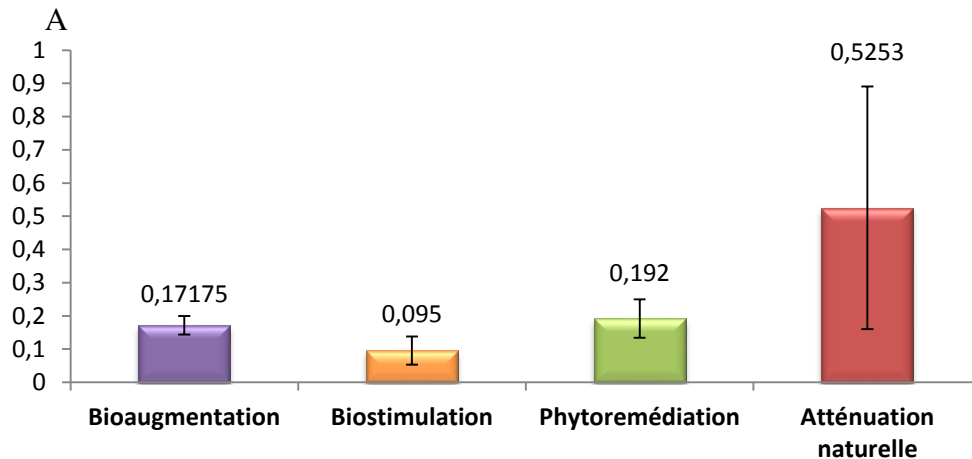


Fig. 7 : Activité de déshydrogénase (DHO).

Le test de Kruskal-Wallis (Annexe XIII) a montré qu'il n'y pas de différence significative entre les différents sols (p -value=0.9189).

I-2-Analyse des HC :

I-2-1-Evaluation de la quantité des hydrocarbures totaux :

L'extraction des HC totaux dans le sol est un critère quantitatif qui permet d'apprécier la quantité des HC qui existent dans le sol. La figure 19 représente la quantité des HC totaux dans les différents traitements.

D'après les résultats, les quantités des HC diffèrent dans les sols traités et non traité. Après décontamination, il restait plus d'hydrocarbures dans le sol non traité (1,65g/100g de sol) que dans celui traité par bioaugmentation (1,05g/100 g de sol), et celui ayant subi une biostimulation. La quantité la plus faible (0,95g/100g de sol) a été obtenue dans le sol traité par phytoremédiation.

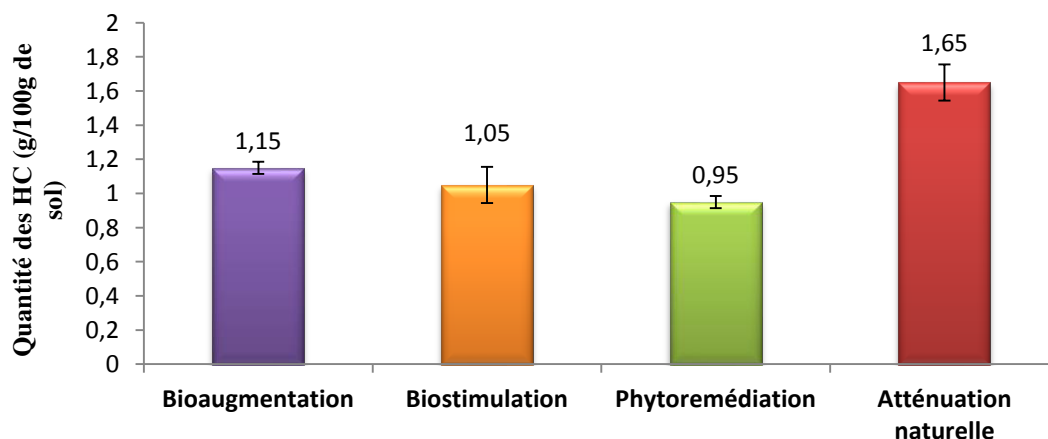


Fig. 8 : Quantité des HC dans les différents sols.

Le test de l'anova (Annexe XIV) montre qu'il y a une différence significative (p -value=0.0385) entre les différents traitements.

Le test de Newman et Keuls (Annexe XV) a fait ressortir deux groupes homogènes. Le groupe « a » qui inclut l'atténuation naturelle, le groupe « b » regroupe la bioaugmentation, la biostimulation et phytoremédiation, ce qui signifie que les trois techniques de décontamination appliquées ont eu une efficacité différente de celle de l'atténuation naturelle. Elles ont réduit de façon significative la quantité d'hydrocarbures dans le sol.

I-3-2-Analyse qualitative des HC :

L'analyse des HC par spectrométrie est un critère qualitatif, permet d'identifier les HC restants dans les sols qui ont subi différents traitements.

Le tableau ci-dessous représente les fractions d'HC identifiées dans les sols après traitement. Nous remarquons que dans les sols traités par les trois techniques, seul le Benzo[a] anthracène a été détecté. Dans le sol non traité, le Benzo[a] anthracène et le Benzo[a] pyrène ont été détectés, sachant que le sol contaminé à l'état initial contenait le Benzo[a] anthracène, le Benzo[a] pyrène et le Dibenzo[a,h] anthracène en quantité plus élevées que celles indiquées dans les sols remédiés et le sol non traité.

Tableau 1 : Analyse des HC par spectroscopie UV.

Traitement	Longueur d'onde (nm)	Absorbance	HAP	Nombre de cycles aromatiques
Bioaugmentation	[282-283]	0.203	Benzo[a] anthracène (286 nm)	4
Biostimulation	[283-284]	0.4055		
Phytoremédiation	[282-283]	0.3565		
Atténuation naturelle	[283-296]	0.653	Benzo[a] pyrène (297 nm)	5
			Benzo[a] anthracène (286 nm)	4
Sol C	286	1,086	Benzo[a] anthracène (286 nm)	4
Sol C	[294-295]	2,732	Dibenzo[a,h] anthracène (297 nm)	5
Sol C	297	2,630	Benzo[a] pyrène 297 (nm)	5

I-3- Effet des hydrocarbures sur le végétal :

I-3-1- Taux de germination :

Pour l'évaluation de la toxicité des carburants vis-à-vis des espèces végétales (maïs et laitue), 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 20 représente le taux de germination du maïs dans les différents sols.

La germination du maïs est différente d'un traitement à un autre, le taux le plus élevé étant obtenu dans le sol traité par bioaugmentation (23.33%), suivi par celui enregistré dans sol traité par biostimulation (20%) puis le taux obtenu dans le sol cultivé. Le taux le plus faible a été enregistré après atténuation naturelle (6.67%).

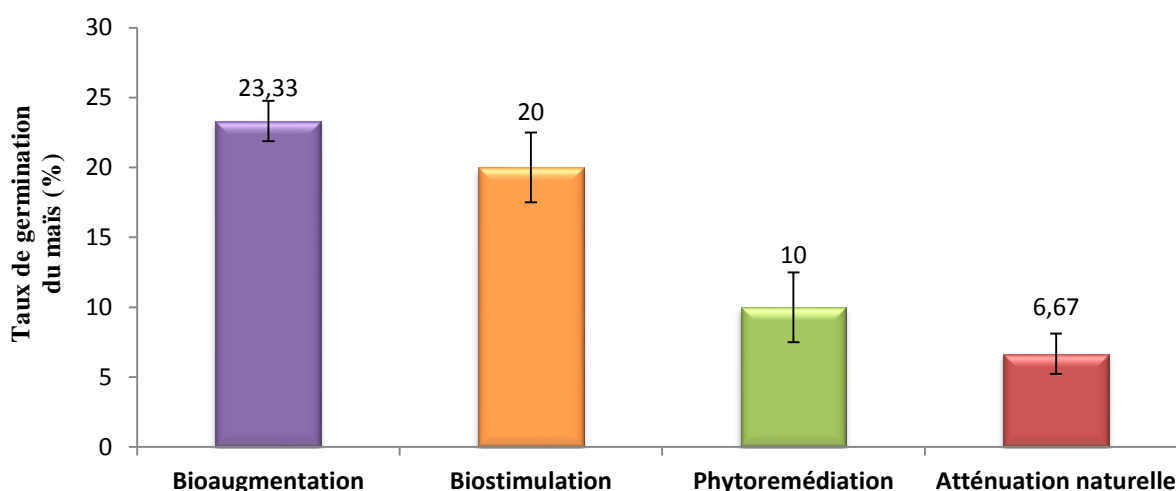


Fig. 9 : Taux de germination du maïs dans les différents sols.

L'anova (Annexe XVI), a révélé un effet hautement significatif des traitements sur le taux de germination du maïs (p-value=0.002982).

Le test de Newman et Keuls (Annexe XVII) a fait ressortir deux groupes homogènes. La bioaugmentation et la biostimulation sont classées dans le groupe « a », la phytoremédiation et l'atténuation naturelle dans le groupe « b ». Cela indique que la bioaugmentation et la biostimulation ont amélioré la germination du maïs par rapport à la phytoremédiation et l'atténuation naturelle.

I-3-1-2-Laitue :

La figure 21 représente le taux de germination de laitue dans quatre sols.

La germination de la laitue est différente d'un traitement à un autre, le taux le plus élevé est marqué par la biostimulation avec 50%, alors que la phytoremédiation a engendré un taux inférieur de près de la moitié (23.33%). Le taux de germination obtenu après l'atténuation naturelle est très proche de celui observé après biostimulation. Un taux de 36,67 a été obtenu après bioaugmentation.

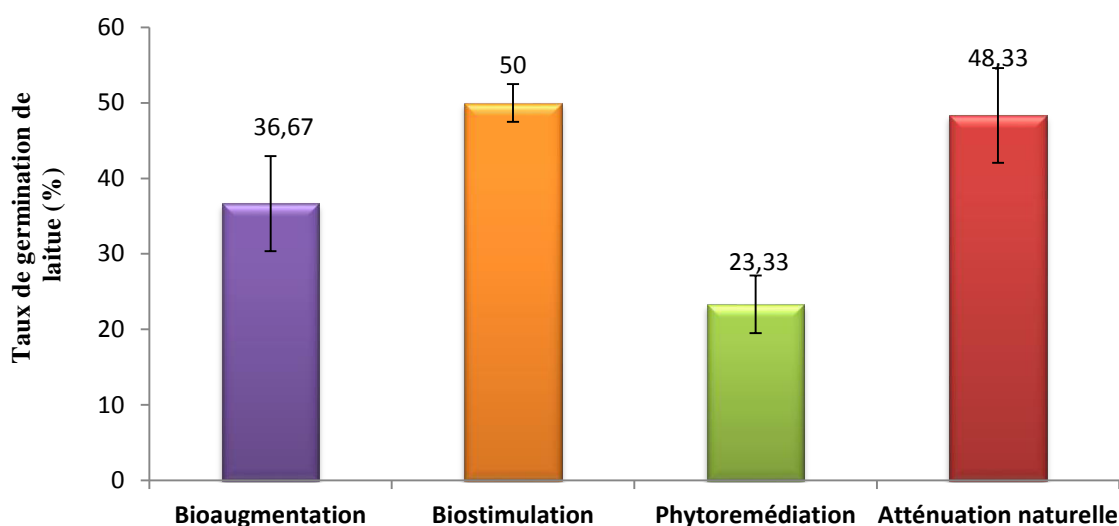


Fig. 10 : Taux de germination de laitue dans les différents sols.

Le test de l'anova à un facteur (Annexe XVIII) a fait ressortir un effet significatif pour le taux de germination de la laitue (p -value=0.03794). Cela indique que la laitue n'a pas germé de la même façon après les traitements.

Le test de Newman et Keuls (Annexe XIX) a classé les sols en trois groupes homogènes. La biostimulation et l'atténuation naturelle appartiennent au groupe « a », la bioaugmentation dans le groupe « ab » et la phytoremédiation dans le groupe « b ». Ce qui signifie que les traitements n'ont pas décontaminé le sol de la même façon.

I-3-2-Elongation racinaire :

Pour l'évaluation de la phytotoxicité des carburants, nous avons mesuré l'élongation racinaire des deux espèces végétales afin de quantifier leur croissance.

I-3-2-1-Mais :

D'après la figure 22 qui représente l'élongation racinaire du maïs après l'application des trois traitements et l'atténuation naturelle, la croissance racinaire la plus importante a été obtenue

après bioaugmentation suivie de la biostimulation puis de la phytoremédiation. Dans le sol non traité, l'élongation racinaire a été la plus faible.

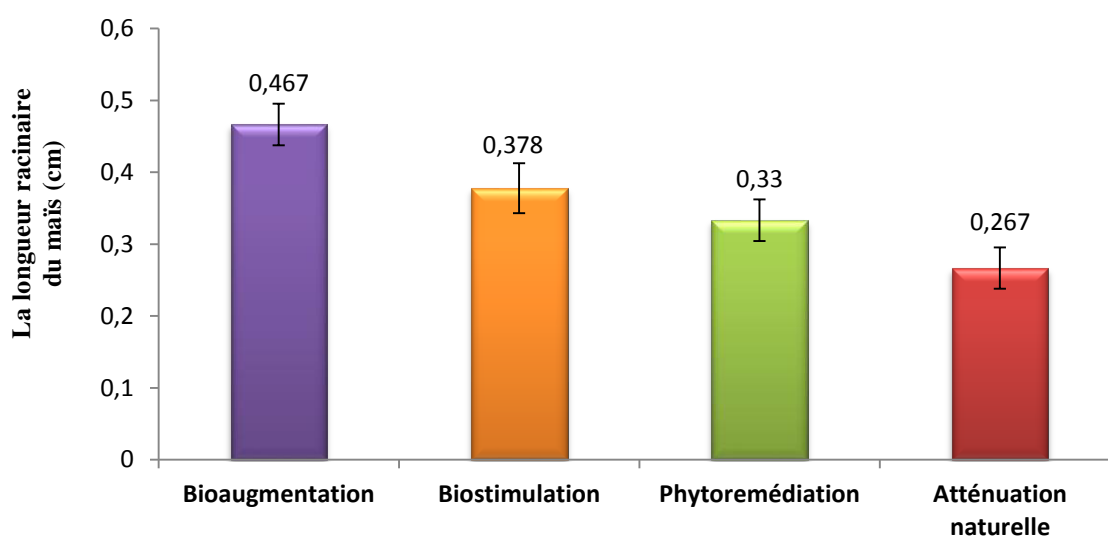


Fig. 11 : Elongation racinaire du maïs dans les différents sols.

L'anova (Annexe XX) a révélé qu'il y avait une différence significative (p -value=0.02191) entre les quatre sols.

Le test de Newman et Keuls (Annexe XXI) a fait ressortir trois groupes homogènes. Le groupe « a » qui inclut la bioaugmentation, le groupe « ab » qui regroupe la biostimulation et la phytoremédiation et le groupe « b » qui contient l'atténuation naturelle. Cela signifie que l'atténuation naturelle n'a pas eu la même efficacité que les trois traitements.

I-3-2-2-La laitue:

D'après la figure 23 qui représente l'élongation racinaire de laitue dans les différents traitements, les valeurs de l'élongation racinaire après biostimulation, bioaugmentation et atténuation naturelle étaient proches les unes des autres. La valeur la plus faible a été observée après phytoremédiation.

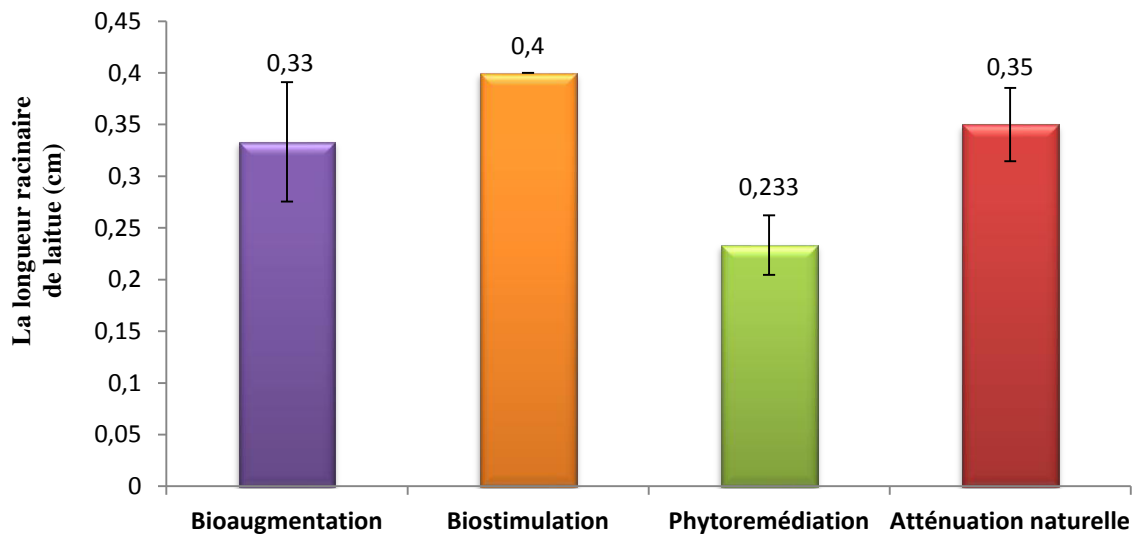


Fig. 12 : Elongation racinaire de la laitue dans les différents sols.

Le test de Kruskal-Wallis (Annexe XXII) montre qu'il n'y a pas de différence significative (p -value=0.2043). Cela indique que les traitements ont la même efficacité dans la décontamination du sol.

II-Discussion :

Les résultats du test respirométrique, du taux de minéralisation du carbone et de la biomasse microbienne ont montré que les valeurs obtenues dans les sols remédiés sont faibles par rapport à celles du sol non traité (atténuation naturelle). Il en est de même pour les activités des enzymes, notamment la PPO et la POD. Les activités enzymatiques sont étroitement associées à la MO, à la biomasse et à l'activité microbienne (Dick, 1997; Tate, 2002; Knight et Dick, 2004).

Certains auteurs affirment qu'une contamination du sol par le gasoil tend à bouleverser l'équilibre biologique du sol. Il modifie généralement la succession des microorganismes, leur nombre augmente grâce à la forte relation positive entre les bactéries hétérotrophes et les hydrocarbures qu'ils dégradent grâce à l'activité des enzymes du sol (Dominguez-Rosado et Pichtel, 2004; Mohsenzadeh et al., 2012). Lorsqu'ils sont utilisés comme substrats, les polluants peuvent avoir une action positive sur l'activité microbienne en induisant une production plus élevée d'enzymes (Wyszkowska et Kucharski ; 2004 Wyszkowska et al., 2006 ; Dindar et al., 2015).

Plusieurs études confirment qu'une contamination par le gas-oil provoque une augmentation significative de tous les paramètres biologiques qui sont : la biomasse

microbienne, la respiration et l'activité enzymatique (Margesin *et al.*, 2004 ; Tejada *et al.*, 2008). Cependant, les activités de la catalase et de la déshydrogénase n'ont pas été affectées significativement par les techniques de décontamination du sol.

Par ailleurs, la diminution de la quantité d'hydrocarbures dans les quatre sols laisse croire qu'une partie de ceux-ci a été dégradée. Ceci est confirmé par l'analyse qualitative qui a montré que certaines fractions ont disparu du sol après traitement, ce qui a conduit à la diminution des activités biologiques dans ces sols car les fractions labiles ont été dégradées. Notons que dans le sol contaminé 3 types d'HC ont été identifiés. Il s'agit du Benzo[a]pyrène (5 cycles), du Dibenzo [a, h] anthracène (5 cycles) et du Benzo[a] anthracène (4 cycles). Dans les sols traités par phytoremédiation, biostimulation et bioaugmentation, un seul type d'HC ; le Benzo[a] anthracène (4cycles), a été identifié avec des quantités différentes d'un traitement à l'autre. Selon Bento *et al.* (2005), la fraction non dégradée correspond aux HC lourds ramifiés et récalcitrants à la biodégradation qui composent le gasoil. Dans le sol non traité (atténuation naturelle), seul le Dibenzo [a, h] anthracène a disparu. L'absence des alcanes pourrait être expliquée par leur volatilisation puisqu'ils sont de faible poids moléculaire ou bien dégradés. Plusieurs travaux montrent que les alcanes peuvent être efficacement dégradés par les microorganismes, car leur structure présente des similitudes avec celle des composés naturels (longues chaînes de carbone comme les acides gras) et il sont facilement utilisés comme source de carbone par les microorganismes (Rojo,2009). Ils sont préférentiellement dégradés par rapport aux autres composés (Das et Mukherjee, 2007).

Les HC résiduels dans ces sols ont quand même eu un effet sur la germination des graines et la croissance des racines, mais l'ampleur de cet effet diffère selon l'espèce végétale. En effet, Chaineau et ses collaborateurs (1997) ont prouvé que les espèces n'avaient pas la même capacité de tolérer la contamination par les hydrocarbures. Dans le même contexte, Duchauffour (1997) a noté que les hydrocarbures perturbaient la croissance des végétaux et leur phytotoxicité dépendait des espèces. La germination et l'élongation racinaire du maïs ont donné des résultats plus concluants que celles de la laitue.

D'après nos résultats, la phytoremédiation s'est avérée comme la technique la plus efficace, suivie par la biostimulation, puis par la bioaugmentation et enfin par l'atténuation naturelle.

Selon Khan et ses collaborateurs (2012), l'utilisation des plantes est efficace pour la décontamination du sol en raison de leur capacité à tolérer les hydrocarbures, transformer les

polluants organiques en une forme moins toxique, par le biais d'oxydation et /ou de réduction, par le biais de leur propres enzymes.

Aussi, la plante fournit les nutriments par les exsudats racinaires, et parfois de l'oxygène pour les populations microbiennes de la rhizosphère, ce qui augmente la biodisponibilité des contaminants pour la plante et les microorganismes (Tanee et Kinako, 2007). Selon Reilley (1996), la dégradation des HAP augmente à mesure que la densité des microbes dans la zone racinaire des plantes augmente. Les enzymes libérées par les racines dans le sol peuvent directement dégrader les HAP, et celles libérées dans l'environnement après la mort des plantes peuvent également continuer à jouer un rôle dans la décomposition des HAP.

Par ailleurs, la dégradation du pétrole a été stimulée par l'apport des fertilisants N et P ceci a été confirmé par Ali Ahmed (2011), Chergui et Dahmani (2009). En effet, la disponibilité des nutriments est un facteur limitant pour la biodégradation dans les sols pollués. La biostimulation avec addition de N et P a été signalée comme un facteur important pour améliorer la bioremédiation des sols (Mariano et *al.* 2007 ; Tanee et Kinako, 2008 ; Abdulsalam et *al.* 2011).

Selon Tanee et Kinako (2008), les HC ont une forte teneur en carbone, et les microorganismes utilisent ou immobilisent les nutriments disponibles (N et P) et créent des carences en nutriments dans les sols contaminés. Ces carences nutritionnelles causées par la contamination aux HC peuvent cependant être compensés par l'application de fertilisants. Lee et ses collaborateurs (2011) ont constaté que l'adjonction d'éléments nutritifs a fortement augmenté l'activité des microorganismes et par conséquent, la biodégradation du gasoil, par rapport au sol non traité. L'addition de nutriments augmenté l'activité biologique, en accélérant la dégradation des HC par la microflore indigène (Polyak et *al.*, 2018).

La bioaugmentation, quant à elle est un moyen d'augmenter la biodégradabilité des contaminants toxiques (Vogel, 1996). En général, le traitement par bioaugmentation est très utile pour la bioremédiation de composés récalcitrants, qui ne pourraient pas être biodégradés par des microorganismes indigènes (Lee et *al.* , 2011). Ghosh et *al.* (2014) ont montré que la souche de *P. aeruginosa* peut être un agent efficace dans la dégradation du pyrène, et aussi dans le processus de traitement biologique ou dans la biorestauration.

Enfin, la diminution de la quantité d'HC dans les sols non traités a également été observée lors de notre étude. Ceci peut être dû à l'activité microbienne du sol. En effet, les

microorganismes se développant naturellement dans le sol, sont déjà présents quand la contamination se produit. Ils ont le potentiel de s'adapter et de procéder immédiatement à la réhabilitation du sol (Doyle, 2008).

Conclusion générale

Conclusion générale :

Dans la présente étude nous avons comparé l'efficacité de quelques techniques biologiques de décontamination d'un sol pollué aux hydrocarbures.

D'après les résultats obtenus au cours de notre travail, nous concluons qu'il y a eu une biodégradation importante des HC dans les sols traités par phytoremédiation, bioaugmentation et biostimulation par rapport au sol non traité (atténuation naturelle).

La qualité biologique du sol a été améliorée par les trois techniques par rapport à l'atténuation naturelle. Ceci se traduit par une diminution de la biomasse et de la respiration microbiennes dans les sols traités, indiquant la dégradation des hydrocarbures labiles au cours du traitement. L'activité enzymatique, notamment celle de la PPO et de la POD était la plus faible dans le sol après phytoremédiation. Les plantes sont une source supplémentaire d'enzymes dans le sol, ce qui aurait accéléré et amélioré la dégradation des hydrocarbures dans le sol cultivé. Ceci est confirmé par la quantité résiduelle des hydrocarbures qui était très faible après phytoremédiation. Cette dernière est suivie en termes d'efficacité de dépollution par la biostimulation et la bioaugmentation. L'atténuation naturelle a été la plus lente présentant des taux plus élevés d'hydrocarbures résiduels avec la présence de fractions récalcitrantes (benzo[a]pyrène et benzo[a]anthracène) par rapport aux sols traités.

Les activités de la catalase et de la déshydrogénase n'ont pas fourni d'informations sur l'efficacité des traitements puisque l'effet de ces derniers n'a pas été significatif sur ces enzymes.

Les résultats obtenus pour la germination et l'élongation racinaire du maïs confirment l'efficacité des traitements par rapport à l'atténuation naturelle avec une augmentation significative de ces paramètres. Les résultats obtenus pour la laitue sont moins concluants.

Afin d'améliorer la dégradation des hydrocarbures dans le sol et d'améliorer par là même la qualité biologique de celui-ci, la culture de la fève, l'ajout de nutriment (N et P) ou l'inoculation du sol avec une souche dégradante d'HC s'avèrent être des solutions efficaces, avec une préférence pour la phytoremédiation.

Parmi les points finaux de mesure étudiés dans ce travail, la biomasse et la respiration microbienne, l'activité des enzymes (surtout la PPO et la POD), ainsi que la germination et l'élongation racinaire du maïs sont les plus pertinents.

Pour les futures études, nous proposons les perspectives suivantes :

- essayer d'appliquer la phytoremédiation, la biostimulation et la phytoremédiation in situ afin de tenir compte de la réalité du terrain et de confirmer ainsi, l'efficacité de ces techniques dans la décontamination du sol.

- faire une étude sur la cinétique de l'activité enzymatique du sol au cours de l'opération de dépollution, vu que les enzymes sont de bons indicateurs de la qualité du sol. Ceci permettrait de comprendre leur mode d'action dans la biodégradation des hydrocarbures.

- entreprendre des essais de décontamination en combinant les techniques testées dans ce travail pour mettre en évidence d'éventuelles synergies entre les technologies appliquées.

Références bibliographiques

La liste des références

- ***Abdelly C.**, 2007 : Bioremédiation / Phytoremédiation SN 232. Institut supérieur de l'éducation et de la formation continue. Départements des sciences naturelles. Université de tunis.p32.
- ***Abdusalam S., Bugaje I.M., Adefila S.S., Ibrahim S.**, 2011 : Comparaison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* Vol. 8 N°1. pp : 187-194.
- ***ADEM**, Agence de l'Environnements et de la Matrice de l'Energie., (2006) : Traitement biologique des sols pollués : recherche et innovation. Paris .92p.
- ***Alilouche M., Toudouft L.**, 2014 : L'effet de quelques carburants (l'essence normale, l'essence super et le gasoil) sur les nodosités des racines de la fève (*Vicia faba L.*) et sur quelques propriétés du sol. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 35p.
- ***Ali ahmed S.**, 2011 : 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 INRA d'Alger.45p.
- ***Alik S., Belkacem L.**, 2015 : Essai de remédiation d'un sol pollué aux hydrocarbures par la technique de bioaugmentation. Mémoire de master en biologie. U.M.M.T.O. 66p.
- ***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.
- ***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.
- ***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.
- ***Bachelier G.**, 1978 : La faune du sol son écologie et son action .Ed.O.R.S.T.O.M. 335p.
- ***Bastida F., Zsolnay A., HernándezT., et García C.**, 2008 : Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma.* Vol. 147.N°3-4. pp :159-171.
- ***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.

- ***Belkacem S., Rouas F.**, 2012 : Toxicité des hydrocarbures vis-à-vis des plantes *Vicia faba* L. et *Trifolium alexandrinum* L. 'essai de phytoremédiation'. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 58p.
- ***Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.C., Frankenberger, W.T.**, (2005): Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by naturel attenuation, bio stimulation, and bio augmentation. *Bioresource Technology*.vol .96. pp: 1049-105.
- ***Bianchi M., Marty D., Bertrand J.C., et Gauthier M.J. (Eds.)** : Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Masson (Paris), chapitre 13 :343-385.
- ***Bidaud C.**, (1998) : Biodégradation des hydrocarbures aromatique polycycliques. Approche Microbiologique et Application au Traitement d'un Sol Pollué.Thèses.Ecole nationale supérieure institut national polytechnique des mines de saint-etienne de grenoble.279p.
- ***Bouderhem A.**, 2011 : utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodetection et la bioremediation des sols pollues par les hydrocarbures. Thèse de magister en Microbiologie appliquée université kasdimerbah-ouargla, faculte des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, département de biologie.64 pp.
- ***Boopathy.R.**, 2000: Factors limiting bioremediation technologies. Reviewpaper. *Bioresource Technology*.vol.74.pp:63-67.
- ***Bourkache R.**, Bousseou 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.
- ***Brown R.A., Norris R.D.**, (1994): The evolution of a technology;hydrogen peroxide in situ bioremediation .in hydrocarbon bioremediation.CRC pressç Boca Raton, Florida.pp148-162.
- ***Burns R.G.**, 1978 : Soil enzymes. London, Academic Press.pp :380.
- ***Carnicer P.**, 2007: La pollution ponctuelle des sols: le cas de station service dans la région de Bruxelles-Capitale. Mémoire, Diplôme d'étude spécialisé en gestion de l'environnement. Université Libre de Bruxelles. 154p.
- ***Carter M.R., Gregorich E.G., Angers D.A., Beare M.H., Sparling G.P., Wardle D.A., et Voroney R.P.**, 1999 : Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions. *Canadian Journal of Soil Science*.Vol. 79.N°4. pp :507-520.
- ***Chaineau 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.
- ***Chaineau C.H., Morel J.L., Oudot J.**, 1997: Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Quali*.Vol. 26. pp: 1478-1483.

- ***Chaussod R., Nicolardot B., Catroux G.**, 1986: Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. Science du Sol. Vol.86. N°2. pp : 201-211.
- ***Chergi R., Dahmani Y.**, 2009 : Essai de décontamination d'un sol pollué naturellement par les hydrocarbures par deux techniques biologiques (biostimulation et bioaugmentation). Mémoire d'ingénieur d'état en biologie. UMMTO. 65p.
- ***Cheverier E.**, 2013 : la phytoremediation, une solution d'avenir pour la Québec. Mémoire en vue de l'obtention du grade de maître de l'environnement (M.Env), universitaire IHERBOOKE.P15-22.
- ***Colin F.**, 2000 : Pollution localisés des sols et sous-sols par les hydrocarbures et les solvants chlorés. Edition Tec et Doc. Paris. 417p.
- ***Colombano S., Saada A., Guerin V., Bataillard P., Bellenfant G., Beranger S., Hube D., Blanc C., Zornig C., Girardeau I.**, 2010 : Quelles techniques pour quels traitements- Analyse coûts- bénéfiques. Rapport final du BRGM. PR-58609-FR. 399p.
- ***Das K., Mukherjee A.K.**, 2007 : Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus Subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil. Bioresource Technologie. Vol.98.pp:1339-1345.
- ***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.
- ***Degranges P., Gugalski T., Leleu M., Greffard J.**, 1977: Devenir des hydrocarbures dans les sols. Rapport du BRGM. 77 SGN 114 MGA. 31p.
- ***Demuysère R.**, 2011 : Développement d'un indice mesurant la stabilité enzymatique relative des sols pour évaluer l'impact d'une contamination organique complexe sur la qualité de sols dans un contexte de remédiation. Mémoire en Génie chimique. Université de Montréal. 188p.
- ***Dick R.P.**, 1997 : Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health. Biological Indicators of Soil Health. C.E. Pankhurst, B.M. Doube et V.V.S.R. Gupta. United Kingdom, Cab international. P : 121-156.
- ***Dindar E., Sagban O., Baskaya H.S.**, 2015: Variations of soil enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil. Journal International Biodeterioration& Biodegradation. Vol. 105. pp: 268-27574.
- ***Dindar E., Topac F.O., Baskaya H.S., Kaya T.**, (2017): Effect of wastewater sludge application on enzyme activities in soil contaminated with crude oil. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. Vol.17.N°1.pp :180.

- ***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.
- ***Dommergues Y.**, 1968 : Principes de méthodologie en microbiologie en microbiologie du sol. Nouveaux documents pour une étude intégrée en écologie du sol. pp : 13-30. Edt Centre National de la Recherche Scientifique.
- ***Doran J.W., et Safley M.**, 1997: Defining and Assessing Soil Health and Sustainable Productivity. Biological Indicators of Soil Health. C.E. Pankhurst, B.M. Doube et V.V.S.R. Gupta. United Kingdom, Cab international. p : 1-28.
- ***Doyle C.**, 2008: La phytoremédiation: une solution à la contamination des sites de traitements du bois? Mémoire en vue de l'obtention du grade de maître en environnement. Université de Sherbrooke Canada. 94p.
- ***Duchaufour P.**, 1991 : Abrégé de pédologie : sol, végétation et environnement. Edt Masson, Paris .334p.
- ***Duchaufour P.**, 2001: Introduction à la science du sol: sol, végétation et environnement. 6^{ème} édition MASSON. Paris Milan Barcelone. 498p.
- ***Fattal P.**, 2008: Pollution des côtes par les hydrocarbures. Presse universitaire de Rennes. 498p.
- ***Fingas M.**, 2013. The Basics of oil spill cleanup. CRC Press, Etats-Unis. pp: 286.
- ***Gerhardt K.E., DongHong X., Glik B.R., Greenberg B.M.**, 2009: phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminant. Plant Science.vol.176. pp: 20-30.
- ***Ghosh I, Jasmine J., Mukherji S.**, 2014: Biodegradation of pyrene by a Pseudomonas aeruginosa strain RS1 isolated from refinery sludge. Bioresource Technology. Vol. 166. pp: 548–558.
- ***Gil-S. F., Trasar C. C., Leiros M.C., et Seoane S.**, 2005 : Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. Soil Biology and Biochemistry.Vol. 37.N°5.pp.877-887.
- ***Girard M., Walter C., Remy C., Bertherlin J., Morel J.L.**, 2005 : Sol et environnement. Edition DUNOD, Paris. 799p.
- ***Glik B.R.**, 2003: Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnology Advances.vol. 21. pp: 383-393.
- ***Guan S.Y.**, 1986: Soil enzymes and research methods in Chinese. China Agricultural Science Press. pp :274–323.

- ***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 : 1926-1935.
- ***Hentati O., Lachhab R., Ayadi M., Ksibi M., 2013:** Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environ. Monit. Assess.* 185, 2989e2998.
- ***Huguenot D., 2010 :** mise au point d'un procede associant bioaugmentation et phytoextraction pour le traitement de sediments viticoles riche en cuivre. Thèse du Doctorat. Université de haute –alsace école doctorale jean-henri lambert-ED.494.300p.
- ***Jenkinson D.S., Powlson D.S., 1976:** The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 8. pp : 167–177.
- ***Jumeau S., 1999 :** Devenir de la contamination en hydrocarbures lors de la mise en dépôt des produits de dragage. Rapport de DEA Sciences et Techniques de l'Environnement. Université Paris XII-Val de Marne.
- ***Kahil L., Issad H., 2014 :** Essai de réhabilitation d'un sol pollué aux hydrocarbures par biostimulation. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 50p.
- ***Kellas K., 2008 :** Toxicité des hydrocarbures vis-à-vis du blé dur (*Triticum durum*), du pois vivace (*Lathyrus latifolius*) et de la microflore du sol. Essai de phytoremédiation. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 69p.
- ***Khan S., Afzal M., Iqbal S., Kha Q.M., (2013):** plant bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*. vol.90. pp:1317-1332.
- ***Knight T. R., et Dick R.P., 2004 :** Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 36. N°12. pp :2089- 2096.
- ***Koller E., 2004 :** Traitement des pollutions industrielles (eau, air déchet, sol, boues). Edition DUNOD. Paris. p280-313.
- ***Koller E., 2009 :** Traitement des pollutions industrielles (eau, air, déchets, sol, boues). Edition DUNOD. Paris .569p.
- ***Larabi T., Moussi K., 2016 :** Effet de la dose du semis de la fève (*Vicia faba L.*) sur l'efficacité de la phytoremédiation d'un sol pollué par les carburants. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie. U.M.M.T.O. 32p.
- ***Laurent F., Crepineau C., Rychen G., Feidet C., Le Roux Y., et Lichtfouse E., 2005 :** Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. p51.

- ***Lee E. H., Yeon-Sil K., Kyung-Suk C.**, 2011: Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil by Natural Attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation Employing *Rhodococcus* sp. EH831. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 39. N°1. pp : 86-92.
- ***Lemière 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.
- ***Li H., Zhang Y., Kravchenko I.Xu.H. et Zhang C.-G.**, 2007 : Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. *Journal of Environmental Sciences.* Vol. 19. N°8. pp: 1003-1013.
- ***Liu R., Xiano 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.* vol473-474.pp:350-358.
- ***Marchal R., Penet S., Solano S.F., Vandecasteele J.P.**, 2003: Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP.* Vol. 58. N° 4. pp: 441- 448.
- ***Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F.**, 2000: Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere.* Vol. 40. pp: 339–34.
- ***Margesin R. et Schinner F.**, 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 67. N° 7. pp: 3127-3133.
- ***Mariano A.P., Kataoka A.P., De Angelis D.F., Bonotto D.M.**, 2007: Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil From a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology.* Vol. 38. pp:346-353.
- ***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.
- ***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: 1507-1516.
- ***Nannipieri P., Kandeler E., et Ruggiero P.**, 2002 : Enzyme Activities and Microbiological and Biochemical Processes in Soil. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications.* R.G. Burns et R.P. Dick, Marcel Dekker, Inc. p : 1- 34.

- ***Neff J. M., Ostazeski S., Gardiner W., et Stejskal I.**, 2000: Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol.19. N° 7 pp:1809-1821.
- ***Njoku K.L., Akinola M.O., AND OBOH B.O.**, 2009: phytoremediation of crude oil contaminated soil: the effect of growth of *glycine max* on the physico-chemistry and crude oil contents of soil. Department of Cell Biology and Genetics. University of Lagos, Akoka Lagos, Nigeria. Vol. 7. N°10. pp 79-87.
- ***Nwinyi O. C., Kanu I. A., Tunde A., Ajanaku K. O.**, 2014 : Characterization of Diesel Degrading Bacterial Species from Contaminated Tropical Ecosystem. *Braz. Arch. Biol. Technol.* Vol. 57. N° 5. pp: 789-796.
- ***Oultaf L.**, 2015 : Etude comparative de l'efficacité de trois techniques de remédiation (phytoremédiation, biostimulation, bioaugmentation) sur des sols pollués par les carburants. Mémoire de Magister. U.M.M.T.O. 90 p.
- ***Patej S.**, 2002 : Etude de scénarios dangereux en stations-service. Rapport final de l'INERIS DRA 40862. 38p.
- ***Pimsee P.**, 2014 : Etude du comportement des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) lors du déversement accidentel d'hydrocarbures en eaux continentales. Thèse du Doctorat. Université de Toulouse. 175 p.
- ***Priac A.**, 2014: *Lactuca sativa L.* : Evaluation écotoxicologique de rejets industriels complexes et de solutions synthétiques. Thèse Ecologie, Environnement. Université de Franche-Comté.Français. 250p.
- ***Reilly K.A., Banks M.K., Schwab A.P.**, 1996: Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere.*J. Environ. Quality*. Vol.25.N° 2.pp:212-21.
- ***Rodríguez-Blanco A., Antoine V., Pelletier E., Delille D.,Ghiglione J.F.**, 2010: Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*.Vol.158.pp:663-673.
- ***Rojo F.**, 2009: Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.* Vol.11. pp: 2477-2490.
- ***Romaniuki R., Brandt J.F.,Rios P.R., GiuffréL.**, 2007: Atenuación natural y remediación inducida en suelos. *CI. SUELO (ARGENTINA)*.Vol.25.N°.2.PP :139-149.
- ***Roudier.P.**, 2008 : Techniques de réhabilitation des sites et sols pollués. DirecteurGénéralAdjoint SITA Remédiation. p40.

- ***Rouquerol T., Amir H., Amir A.**, 1987: Effet de l'épandage de résidu pétrolier de raffinerie sur l'évolution de la matière organique. L'activité de densité microbienne d'un sol agricole. *Revue d'écologie et de biologie du sol*. 156p.
- ***Saada A., Nowak C., Coquereau N.**, 2005 : Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures. Rapport du BRGM.RP 53739-FR. 107p.
- ***Sadoudi-Ali Ahmed D., Ali Ahmed S., Dahmani Y., Chergui R.**, 2014: Treatment of an oil polluted soil by injected *Pseudomonas aeruginosa* and produced rhamnolipid. *International journal of environmental engineering science and technology research*. Vol. 2. N°1. pp:1-9.
- ***Silva-Castro G.A., Perucha C., Laguna J., Gonzláz-López J., Calvo C** (2013). Bioremediation of diesel-polluted soil using bio stimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents: Assays in a pilot plant. *Science of the Total Environment*.vol445-446.pp: 347-355.
- ***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.
- ***Sonatrach** (2010).www. Algérie-energie.com.
- ***Syakti A.D.**, 2004 : Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques de bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat. Université de Droit, d'Economie et des Sciences (Aix Marseille III). Marseille. France. 220 p.
- ***Tanee F. B. G., Kinako P.D.S.**, 2008: Comparative Studies of Biostimulation and Phytoremediation in the Mitigation of Crude Oil Toxicity in Tropical Soil *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* Vol. 12. N°2. pp: 143-147.
- ***Tejeda 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). *BioresourceTechnology*. Vol.8. N°99.pp: 2872-2880.
- ***Vanobberghen.** , la phytoremediation en Wallonie : évaluation du potentiel d'assainissement du sol contaminé en métaux lourds .Mémoire de master en Science et Gestion de l'environnement .universitaire de Bruxelles .p48-53.
- ***Vioko D.E., et Fashemi D.S.**, 2005: Growthresponse of *Ricinuscommunis* (Castoroil) in spentlubricatingoil-pollutedsoil. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*.Vol. 9. N°2. pp: 73-79.
- ***Vogel T. M.**, 1996: Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curent opinion in Biotechnology*, 7: 311-316.

***West et Bridget**, 2001-phytoremediation: A Natural approach for toxiccleanup. Information Technology Service. CALNIFORNIA. Institute of Technology.

***Wyszkowska J., KucharskiM.J., Kucharski J., Polish J.**, 2006: Application of the Activity of Soil Enzymes in the Evaluation of Soil Contamination by Diesel Oil.Polish J. of Environ. Stud.Vol.15.N°3.pp: 501-506.

Liste des annexes

Annexe I : Résultats bruts de tous les paramètres.

*Test respirométrique :

Traitement	V acide (ml)	V NaOH fixé	Masse CO ₂ fixée (mg/100g du sol)	C-CO ₂ (mg /100g du sol)
Sol 1	6	28,5	313,5	85,5
Sol 1	5,6	26,6	292,6	79,8
Sol 1	5,8	27,55	303,05	82,65
Sol 2	4,9	23,275	256,025	69,825
Sol 2	5	23,75	261,25	71,25
Sol 3	5	23,75	261,25	71,25
Sol 3	4	19	209	57
Sol 3	4,7	22,325	245,575	66,975
Sol 4	7,7	36,575	402,325	109,725
Sol 4	7,5	35,625	391,875	106,875
Sol 4	7,5	35,625	391,875	106,875

* Taux de minéralisation de carbone :

Traitement	C-CO ₂ /C total (%)
Sol 1	10,42682927
Sol 1	9,731707317
Sol 1	10,07926829
Sol 2	8,515243902
Sol 2	8,68902439
Sol 3	8,68902439
Sol 3	6,951219512
Sol 3	8,167682927
Sol 4	13,38109756
Sol 4	13,03353659
Sol 4	13,03353659

Le carbone total dans le sol non contaminé 8.2%.

*Biomasse microbienne :

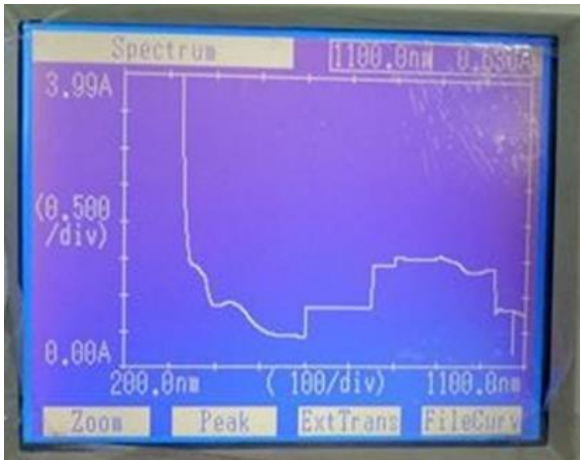
Sols fumigés	V dans le sol fumigé (ml)	V dans le sol non fumigé (ml)
Sol 1	0,12	0,1
Sol 1	0,11	0,09
Sol 1	0,13	0,11
Sol 2	0,12	0,11
Sol 2	0,11	0,1
Sol 2	0,11	0,1
Sol 3	0,11	0,1
Sol 3	0,09	0,09
Sol 3	0,09	0,08
Sol 4	0,13	0,1
Sol 4	0,12	0,1
Sol 4	0,19	0,16

*Activité de CAT (le volume de KMnO_4 qui y a réagi avec le H_2O_2) :

Traitement	V de KMnO_4 (ml)
Sol 1	0,2
Sol 1	0,3
Sol 2	0,2
Sol 2	0,19
Sol 3	0,2
Sol 3	0,12
Sol 4	0,3
Sol 4	0,33
Témoin 1 (sans sol)	1,8
Témoin 2(sans sol)	1,7

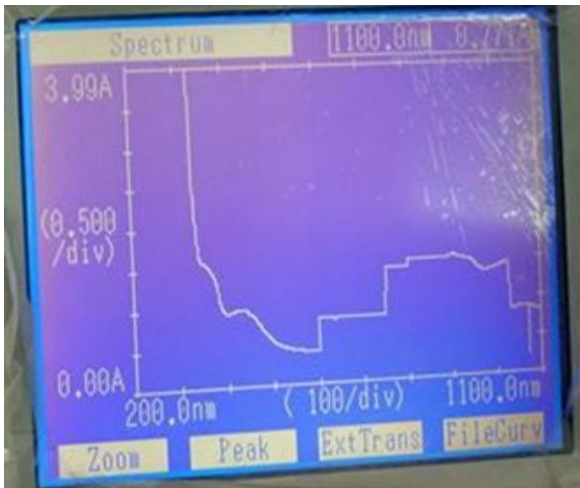
*Activité de PPO :

Sol 1 (1^{ère} répétition) :



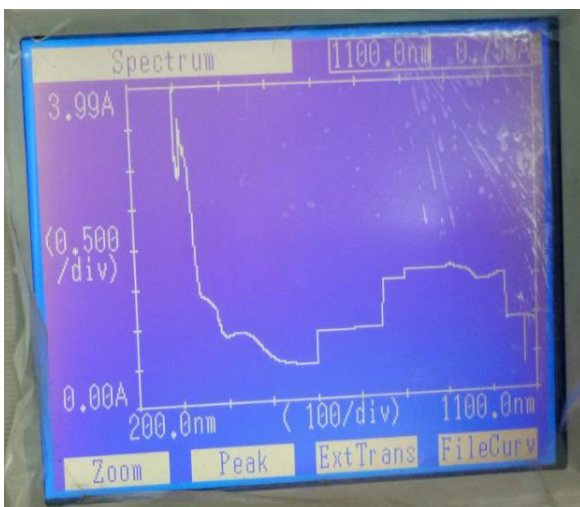
Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1042.0	0.829		
1022.0	1.398		
905.0	1.563		
801.0	1.540		
739.0	0.832		
626.0	0.848		
577.0	0.438		
433.0	0.901		

Sol 1 (2^{ème} répétition) :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1075.0	0.853		
985.0	1.565		
803.0	1.532		
650.0	0.835		
431.0	0.979		

Sol 2 (1^{ère} répétition) :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1067.0	0.953		
1048.0	0.956		
904.0	1.653		
808.0	1.613		
627.0	0.879		
433.0	0.915		
307.0	3.615		

Sol 2 (2^{ème} répétition) :



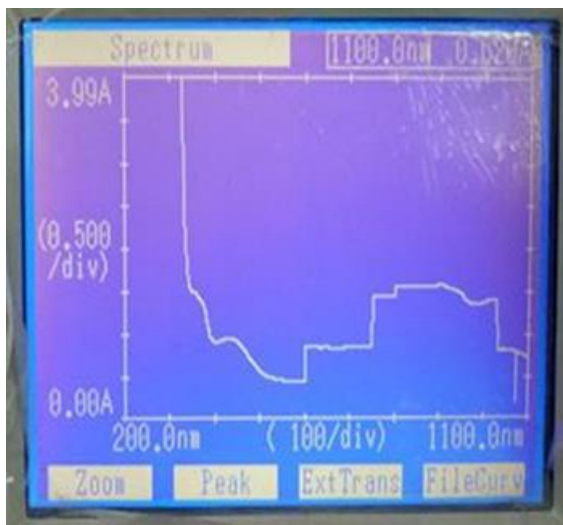
Sol 3 (1^{ère} répétition) :



Sol 3 (2^{ème} répétition) :



Sol 4 (1^{ère} répétition) :

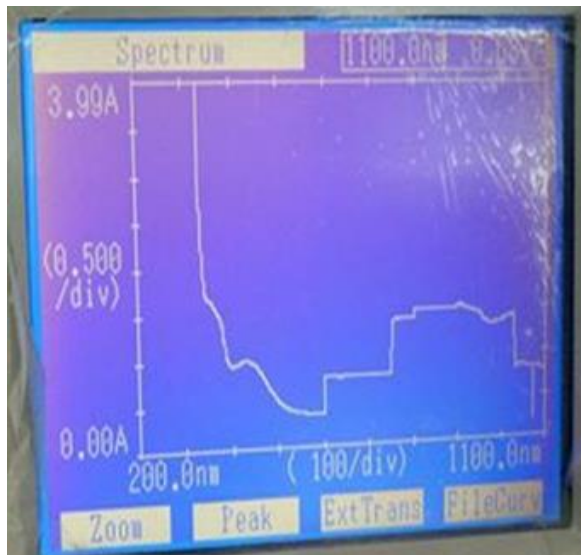


Peak detection

Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1044.0	0.826		
905.0	1.590		
814.0	1.568		
646.0	0.852		
627.0	0.854		
432.0	0.958		

Graph Valley

Sol 4 (2^{ème} répétition) :

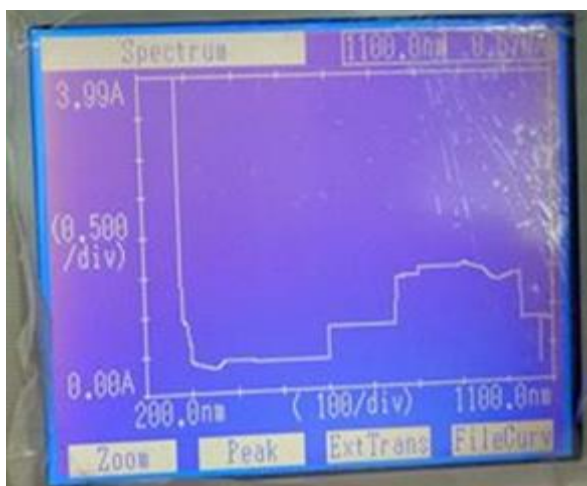


Peak detection

Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1068.0	0.824		
1048.0	0.829		
905.0	1.537		
806.0	1.502		
711.0	0.796		
627.0	0.782		
432.0	0.994		

Graph Valley

Témoin 1



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	0.489		
537.0	0.405		
467.0	0.410		
388.0	0.422		

Graph Valley

Témoïn 2



*Activité de POD :

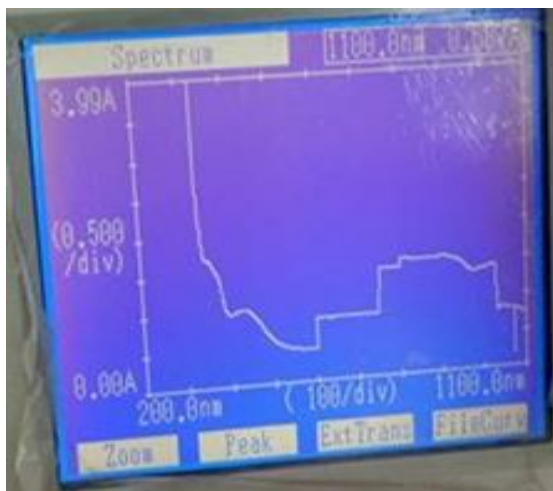
Sol 1 (1^{ère} répétition) :



Sol 1 (2^{ème} répétition) :

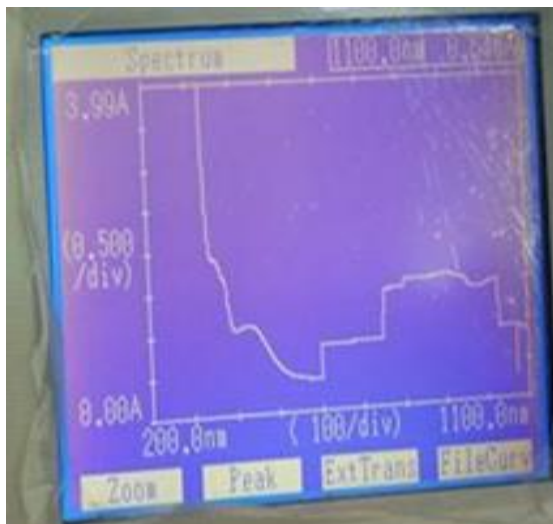


Sol 2 (1^{ère} répétition) :



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	0.858		
432.0	1.027		

Sol 2 (2^{ème} répétition) :



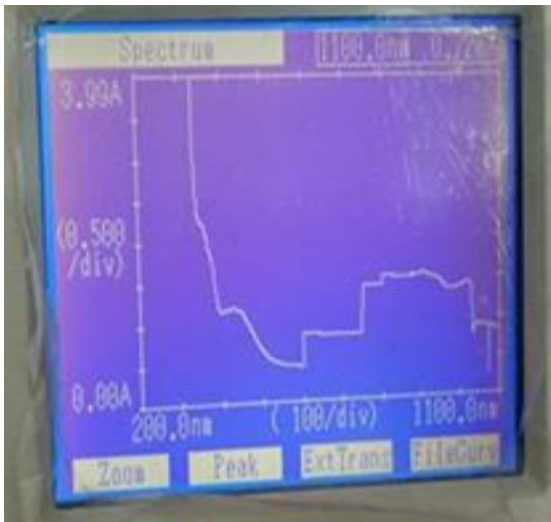
Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1050.0	0.908		
904.0	1.604		
629.0	0.811		
430.0	1.095		

Sol 3 (1^{ère} répétition) :



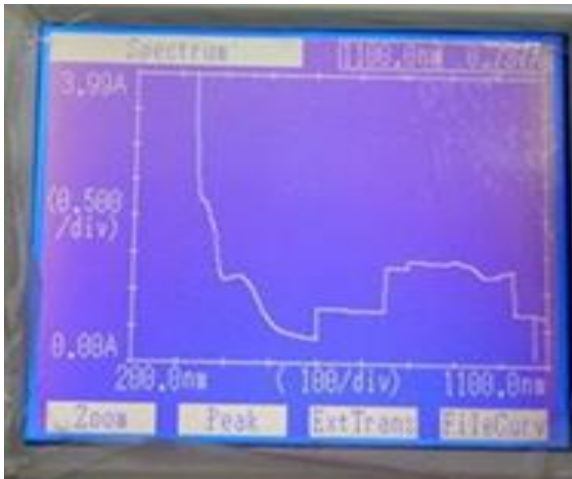
Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1050.0	0.500		
1029.0	1.301		
905.0	1.424		
801.0	1.412		
640.0	0.744		
432.0	1.100		

Sol 3 (2^{ème} répétition) :



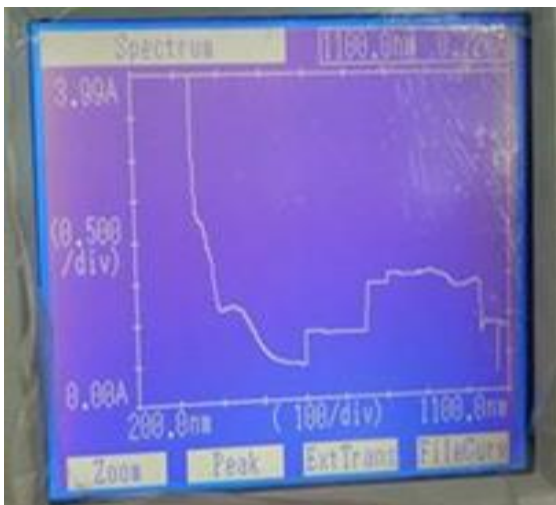
Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1041.0	0.914		
1021.0	1.432		
904.0	1.573		
887.0	1.542		
789.0	0.836		
636.0	0.864		
429.0	1.199		

Sol 4 (1^{ère} répétition) :



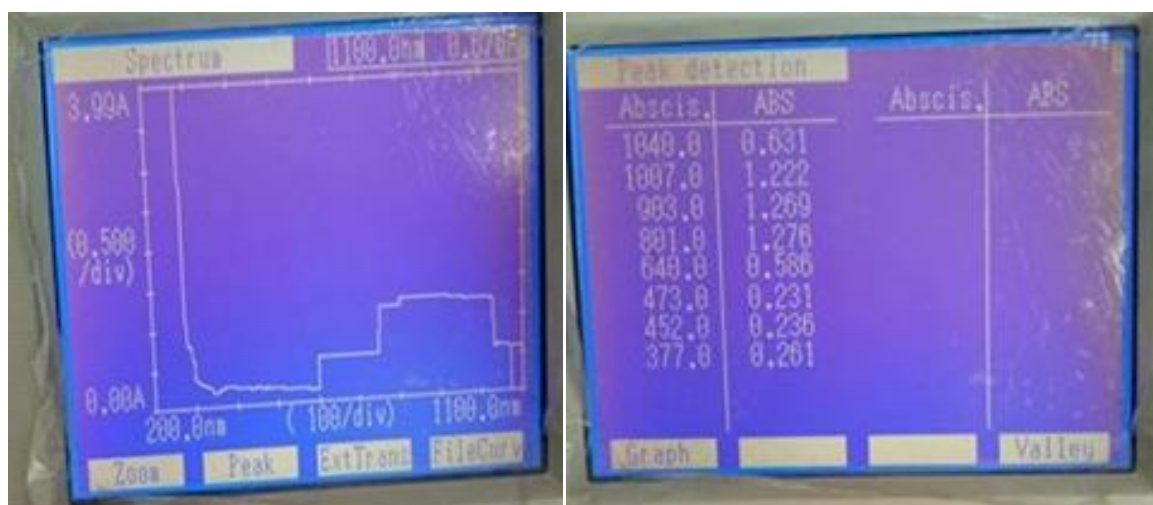
Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1050.0	0.599		
1029.0	1.391		
905.0	1.424		
881.0	1.412		
640.0	0.744		
432.0	1.189		

Sol 4 (2^{ème} répétition) :

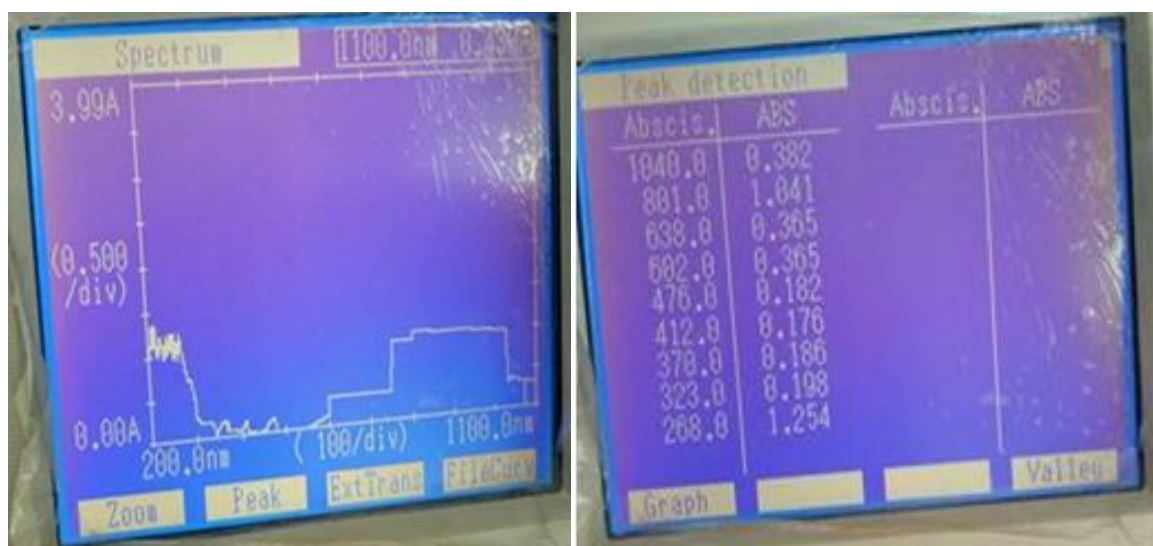


Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
1041.0	0.914		
1021.0	1.432		
904.0	1.573		
887.0	1.542		
789.0	0.836		
636.0	0.864		
429.0	1.199		

Témoins 1



Témoins 2



*Activité de DHO :

Sol 1 (1^{ère} répétition) :



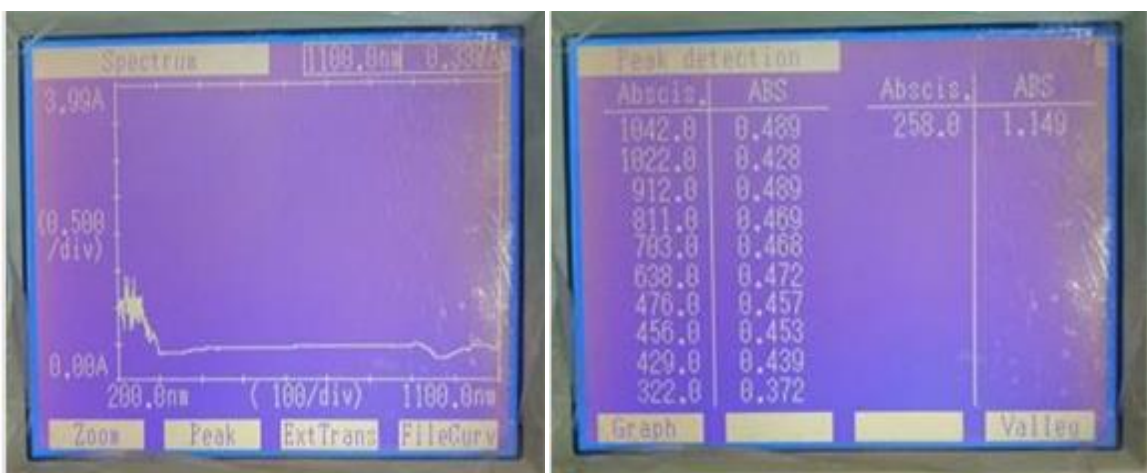
Sol 1 (2^{ème} répétition) :



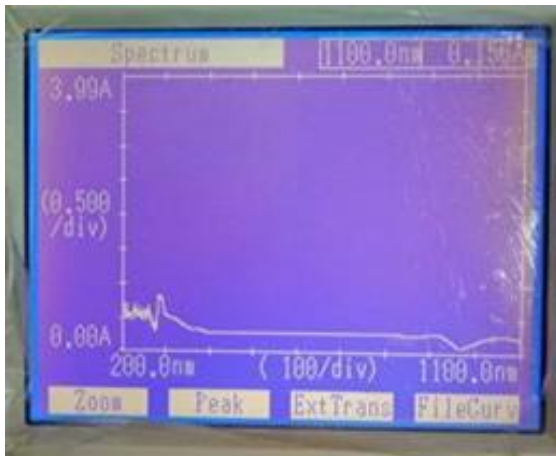
Témoin 1



Témoin 2

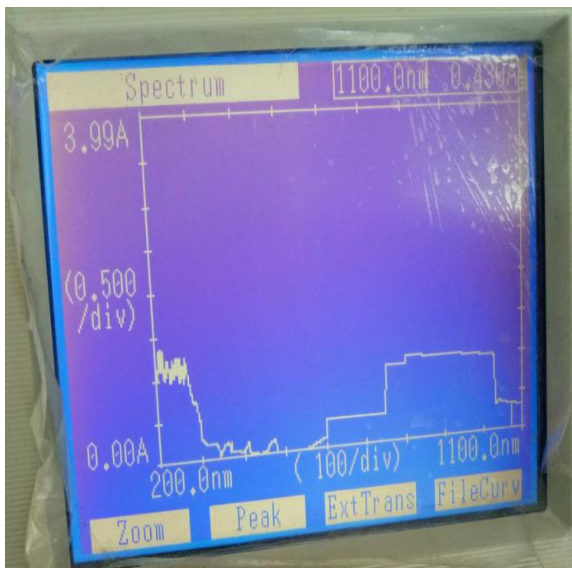


Sol 2 (1^{ère} répétition) :



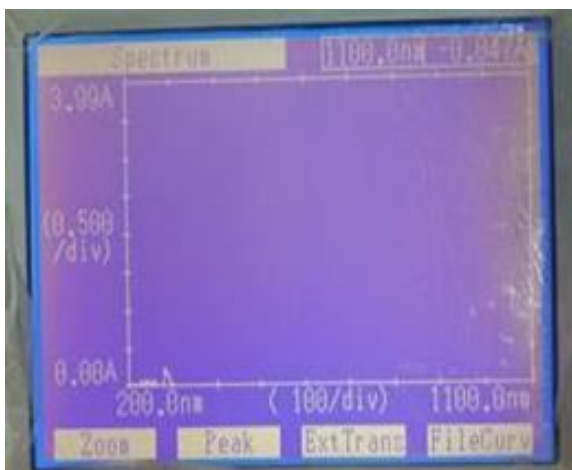
Abcis.	ABS	Abcis.	ABS
1055.0	0.266		
912.0	0.295		
806.0	0.286		
674.0	0.296		
487.0	0.288		
463.0	0.291		
285.0	0.819		

Sol 2 (2^{ème} répétition) :



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		

Témoïn 1



Abcis.	ABS	Abcis.	ABS
1042.0	0.009	322.0	-0.003
1026.0	-0.032	283.0	0.248
911.0	0.019		
813.0	-0.003		
761.0	-0.006		
705.0	-0.004		
649.0	-0.003		
476.0	-0.016		
457.0	-0.018		
432.0	-0.028		

Témoïn 2



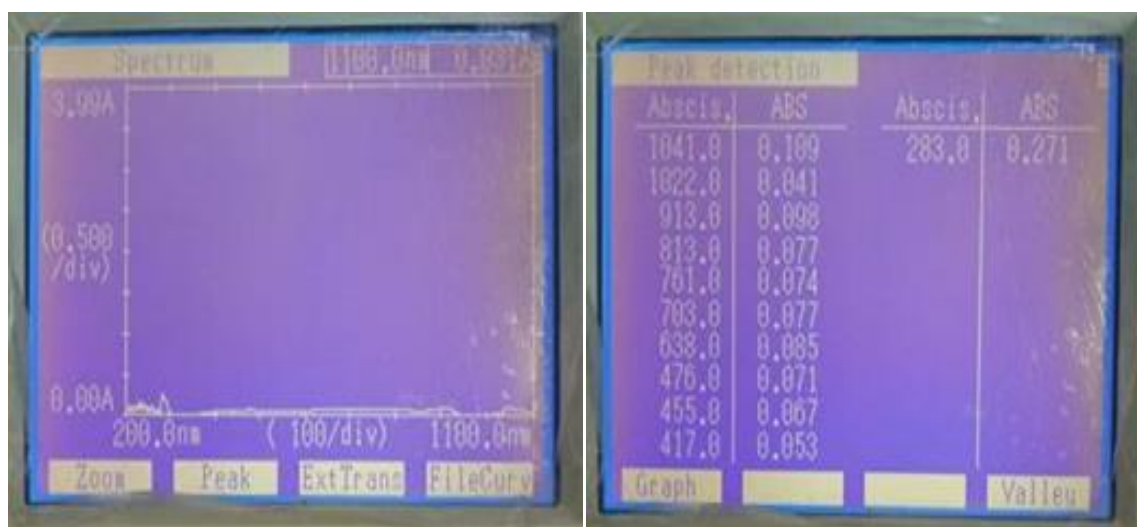
Sol 3 (1^{ère} répétition) :



Sol 3 (2^{ème} répétition) :



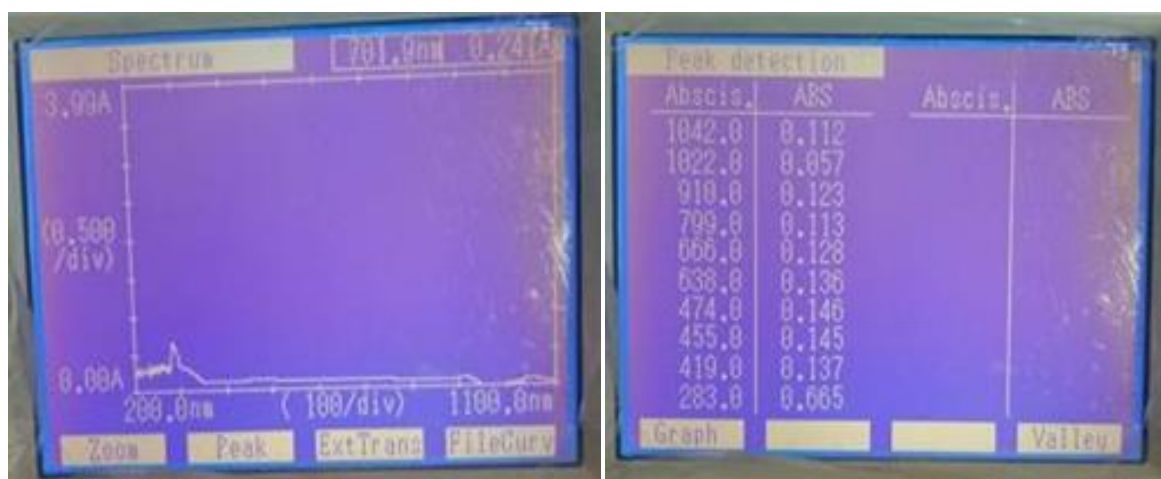
Témoins 1



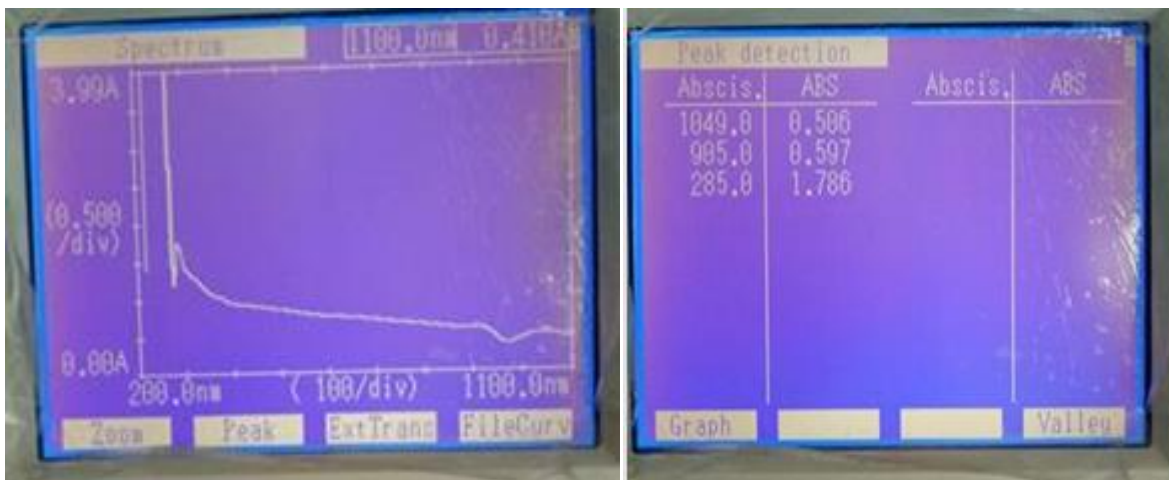
Témoins 2



Sol 4 (1^{ère} répétition) :



Sol 4 (2^{ème} répétition) :



Témoin 1



Témoin 2



*Quantité des hydrocarbures totaux :

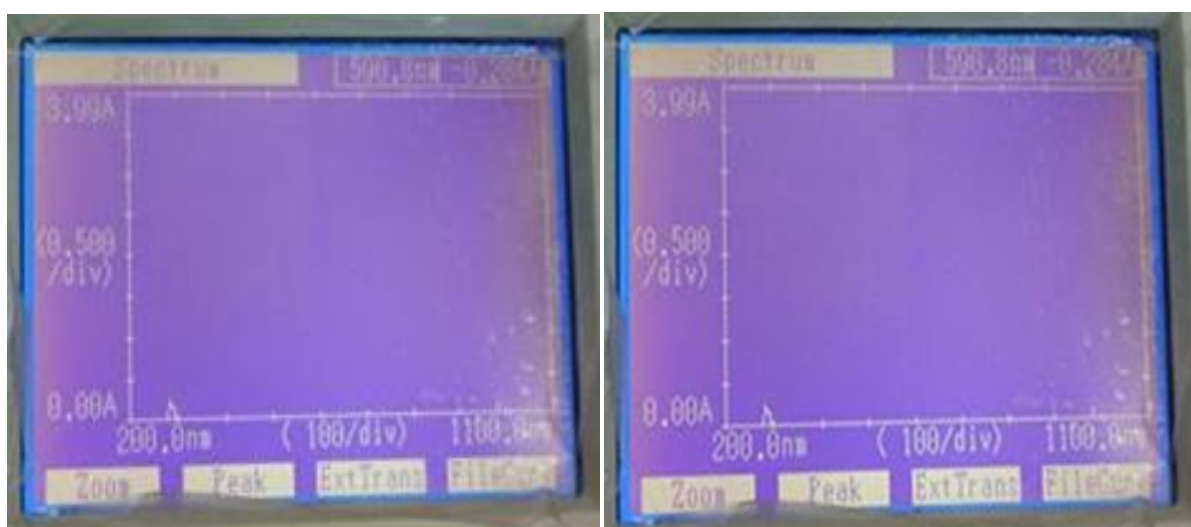
Traitement	Quantité des HCT (g)
Sol 1	1,2
Sol 1	1,1
Sol 2	1,2
Sol 2	0,9
Sol 3	1
Sol 3	0,9
Sol 4	1,5
Sol 4	1,8

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

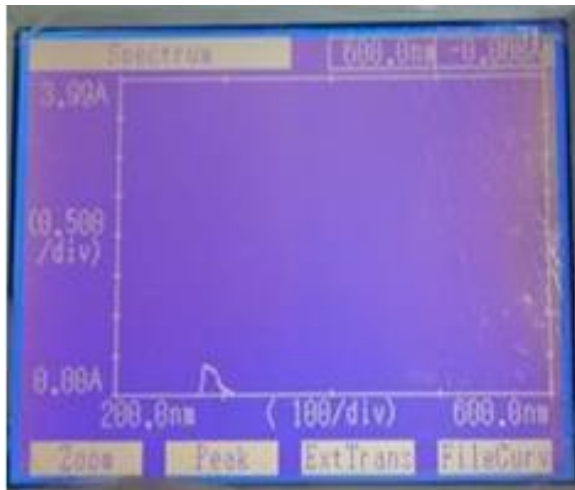
Sol 1 (1^{ère} répétition) :



Sol 1 (2^{ème} répétition):



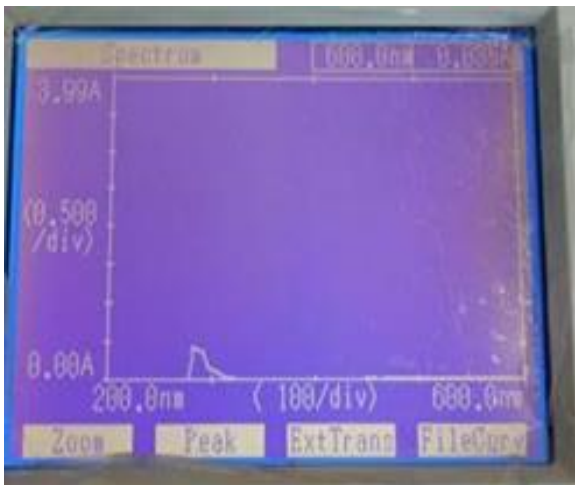
Sol 2 (1^{ère} répétition) :



Peak detection			
Abcis.	ABS	Abcis.	ABS
463.0	-0.077		
441.0	-0.077		
373.0	-0.072		
284.0	0.388		

Graph Valley

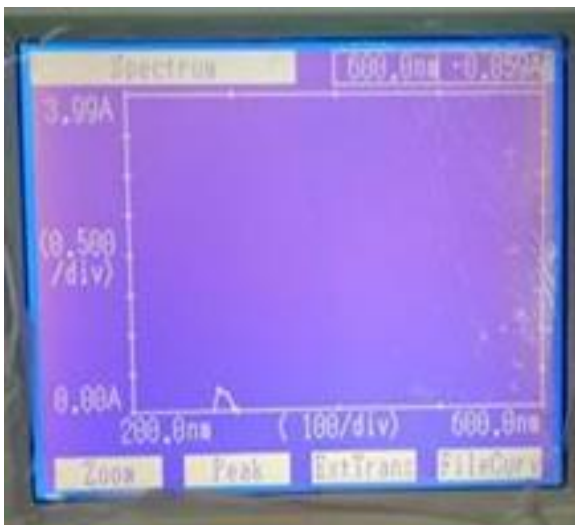
Sol 2 (2^{ème} répétition) :



Peak detection			
Abcis.	ABS	Abcis.	ABS
470.0	0.033		
454.0	0.027		
416.0	0.015		
283.0	0.423		

Graph Valley

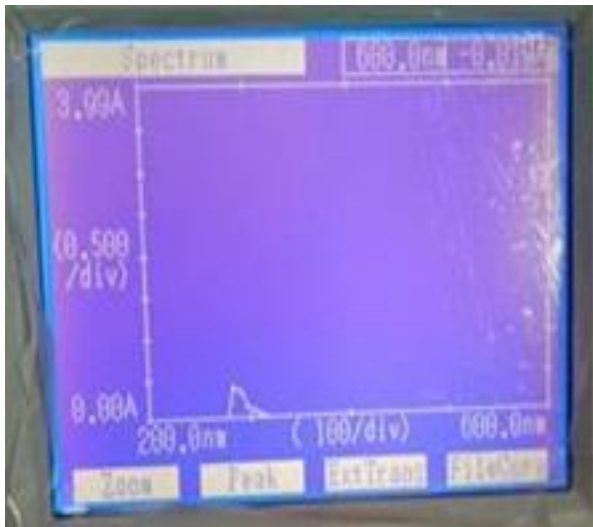
Sol 3 (1^{ère} répétition) :



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

Graph Valley

Sol 3 (2^{ème} répétition) :

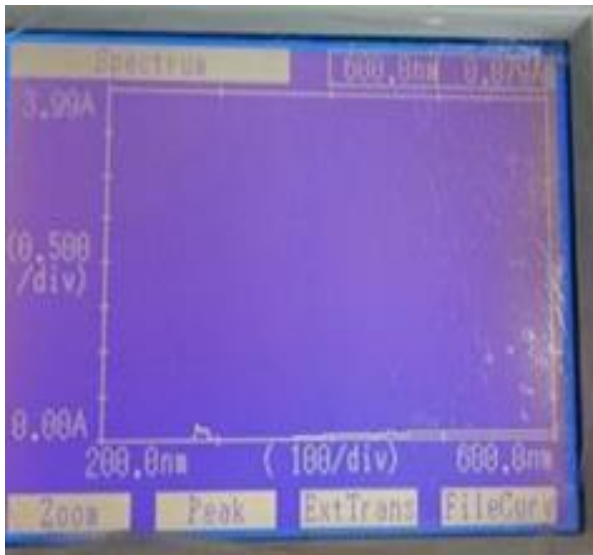


Peak detection

Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
457.0	-0.029		
385.0	-0.035		
283.0	0.392		

Graph Valley

Sol 4 (1^{ère} répétition) :

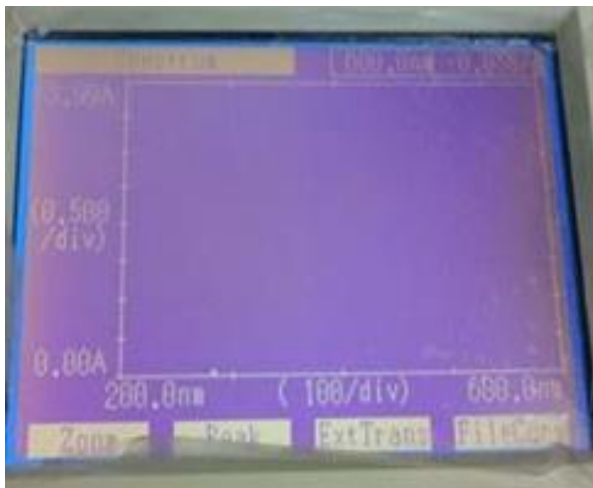


Peak detection

Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
475.0	0.000		
454.0	0.071		
416.0	0.053		
283.0	0.168		

Graph Valley

Sol 4 (2^{ème} répétition) :

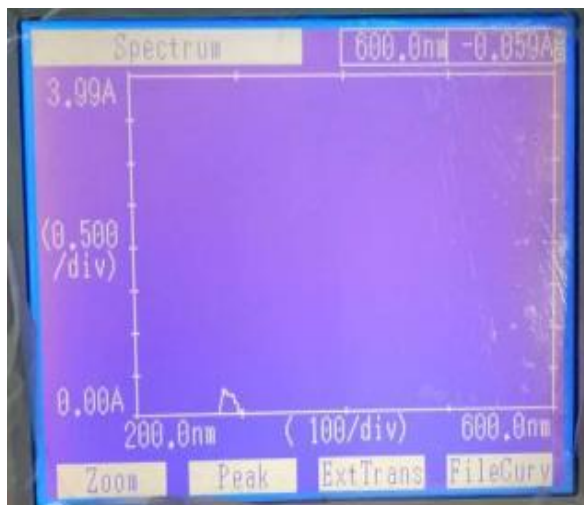


Peak detection

Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
464.0	-0.068		
441.0	-0.070		
283.0	0.072		

Graph Valley

Sol (NC) 1ère répétition :



Peak detection

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

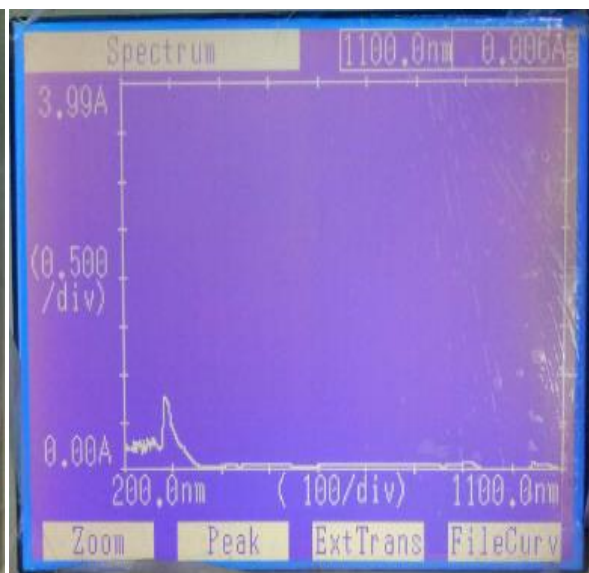
Graph Valley

Sol (NC) 2ème répétition :

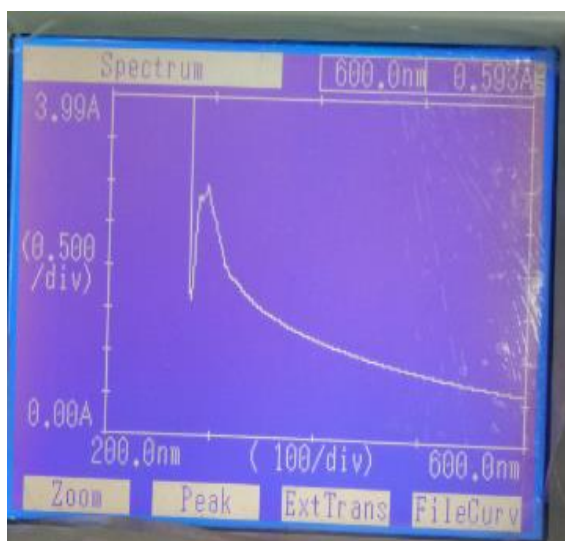
Peak detection

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) 1ère répétition :

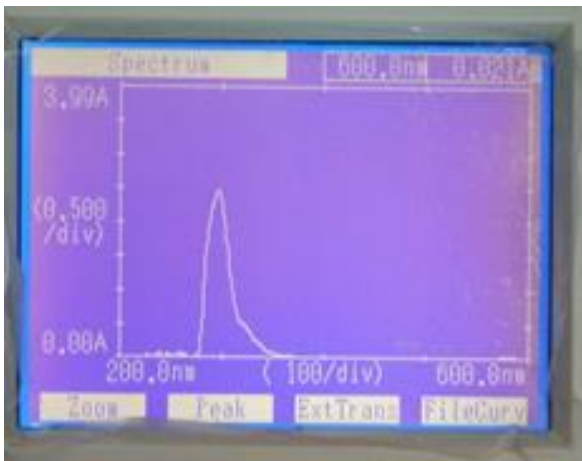


Peak detection

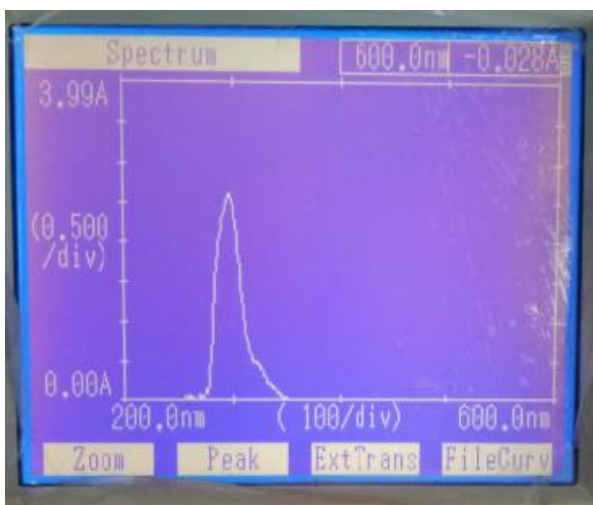
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
294.0	2.977		

Graph Valley

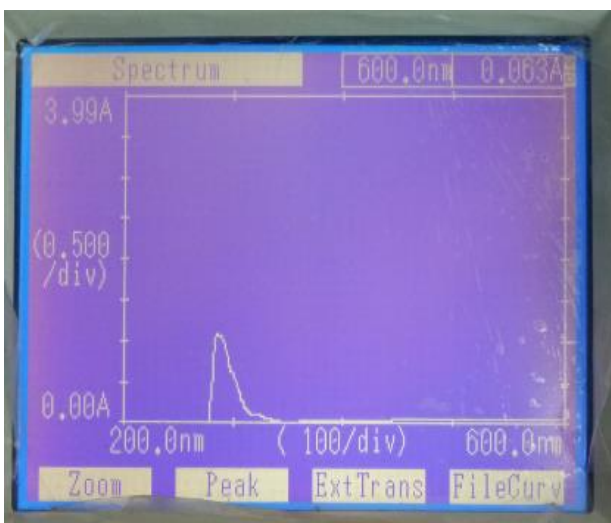
Sol (C) 2^{ème} répétition :



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
453.8	0.008		
295.8	2.467		



Peak detection			
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
537.0	-0.028		
296.0	2.630		



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

*Taux de germination du maïs et de laitue.

Type de sol	Nombre de graines de Maïs germées	Nombre de graines de Laitue germées
Sol 1	5	10
Sol 1	4	5
Sol 1	5	7
Sol 2	4	9
Sol 2	3	10
Sol 2	5	11
Sol 3	2	6
Sol 3	3	3
Sol 3	1	5
Sol 4	2	12
Sol 4	1	7
Sol 4	1	10
Témoin 1	7	16
Témoin 2	4	15

*Elongation racinaire du maïs et de laitue (cm) :

Type du sol	Les boites	Maïs	Laitue	Maïs	Laitue
		1 ^{ère} mesure	2 ^{ème} mesure	1 ^{ère} mesure	2 ^{ème} mesure
Sol 1	1	1,6	2,1	2	2,3
Sol 1	1			1	1,5
Sol 1	2	1,9	2,4	1,4	1,6
Sol 1	3	1,6	2	1,5	1,9
Sol 2	1	1	1,3	1,6	2
Sol 2	2	2,7	3,1	1,6	1,8
Sol 2	2			0,6	1,2
Sol 2	3	2,7	3		
Sol 2	3	1,4	1,9		
Sol 2	3	1,5	2		
Sol 3	1	1,8	2,1	1,2	1,3

Type du sol	Les boites	Mais	Laitue	Mais	Laitue
		1 ^{ère} mesure	2 ^{ème} mesure	1 ^{ère} mesure	2 ^{ème} mesure
Sol 3	2	1,5	2	1,8	2,1
Sol 3	3	3	3,3	1,5	1,6
Sol 3	3	1	1,4		
Sol 3	3	1	1,5		
Sol 4	1	1,8	2		
Sol 4	1	1,3	1,5	0,2	0,5
Sol 4	2	1,5	1,7		
Sol 4	2	1,7	2,1		
Sol 4	3	2,7	3	0,9	1,3
	Témoin 1	1,3	4,5	0,5	1
	Témoin 1	0,3	5	0,3	0,8
	Témoin 2	0,2	0,9	0,2	0,8
	Témoin 2			0,3	1

Annexe II : Test de l'anova à un facteur pour le test respirométrique :

```

Analysis of Variance Table

Response: c.co2
      Df  Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
sol      3 3121.22 1040.41  56.185 2.901e-05 ***
Residuals 7  129.62   18.52

```

Annexe III: Test de Newman et Keuls pour le test respirométrique :

```

$groups
      trt  means M
1 sol4 107.8250 a
2 sol1  82.6500 b
3 sol2  70.5375 c
4 sol3  65.0750 c

```

Annexe IV: Test de l'anova à un facteur pour le taux de minéralisation :

```

Analysis of Variance Table

Response: mineralisa
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
sol      3  46.419  15.4731   56.185 2.901e-05 ***
Residuals 7   1.928   0.2754
  
```

Annexe V: Test de Newman et Keuls pour le taux de minéralisation :

```

$groups
      trt      means M
1 sol4 13.149390 a
2 sol1 10.079268 b
3 sol2  8.602134 c
4 sol3  7.935976 c
  
```

Annexe VI: Test de l'anova à un facteur pour la biomasse microbienne :

```

Analysis of Variance Table

Response: biomasse
      Df  Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
sol      3 14.4458  4.8153  19.303 0.0009178 ***
Residuals 7  1.7462  0.2495
  
```

Annexe VII: Test de Newman et Keuls pour la biomasse microbienne :

```

$groups
      trt      means M
1 sol4  4.315789 a
2 sol1  3.236842 b
3 sol3  1.618421 c
4 sol2  1.618421 c
  
```

Annexe VIII: Test de l'anova à un facteur pour l'activité de CAT :

```

Analysis of Variance Table

Response: catalase
      Df      Sum Sq      Mean Sq F value  Pr(>F)
sol      3 4.2969e-16 1.4323e-16  4.2146 0.09919 .
Residuals 4 1.3594e-16 3.3984e-17
  
```

Annexe IX: Test de l'anova à un facteur pour l'activité de PPO :

```
Analysis of Variance Table

Response: lappo
          Df    Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
sol         3 0.261534 0.087178  64.618 0.0007612 ***
Residuals  4 0.005396 0.001349
```

Annexe X: Test de Newman et Keuls pour l'activité de PPO :

```
$groups
      trt  means M
1 sol4 0.54525 a
2 sol1 0.50925 a
3 sol2 0.48375 a
4 sol3 0.09825 b
```

Annexe XI: Test de l'anova à un facteur pour l'activité de POD :

```
Analysis of Variance Table

Response: lapod
          Df    Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
sol         3 0.068848 0.0229493  34.317 0.00259 **
Residuals  4 0.002675 0.0006688
```

Annexe XII: Test de Newman et Keuls pour l'activité de POD :

```
$groups
      trt  means M
1 sol4 0.97975 a
2 sol1 0.97080 a
3 sol2 0.84725 b
4 sol3 0.75575 c
```

Annexe XIII: Test de Kruskal-Wallis pour l'activité de DHO :

```
Kruskal-Wallis rank sum test

data: dho by sol
Kruskal-Wallis chi-squared = 0.5, df = 3, p-value = 0.9189
```

Annexe XIV: Test de l'anova à un facteur pour l'évaluation de la quantité des hydrocarbures totaux.

```

Analysis of Variance Table

Response: extc
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
sol      3    0.58  0.19333   7.7333 0.0385 *
Residuals 4    0.10  0.02500
  
```

Annexe XV: Test de Newman et Keuls pour l'analyse des hydrocarbures.

```

$groups
      trt means M
1 sol4  1.65 a
2 sol1  1.15 b
3 sol2  1.05 b
4 sol3  0.95 b
  
```

Annexe XVI : Test de l'anova à un facteur pour le taux de germination du maïs.

```

Analysis of Variance Table

Response: Gmais
      Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
sol      3 566.67 188.889  11.333 0.002982 **
Residuals 8 133.33  16.667
  
```

Annexe XVII : Test de Newman et Keuls pour le taux de germination du maïs.

```

$groups
      trt      means M
1 sol1 23.333333 a
2 sol2 20.000000 a
3 sol3 10.000000 b
4 sol4  6.666667 b
  
```

Annexe XVIII : Test de l'anova à un facteur pour le taux de germination de la laitue.

```

Analysis of Variance Table

Response: Glaitue
      Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
sol      3 1372.9  457.64  4.5764 0.03794 *
Residuals 8  800.0  100.00
  
```

Annexe XIX : Test de Newman et Keuls pour le taux de germination de la laitue.

```
$groups
  trt  means  M
1 sol2 50.00000 a
2 sol4 48.33333 a
3 sol1 36.66667 ab
4 sol3 23.33333 b
```

Annexe XX : Test de l'anova à un facteur pour l'élongation racinaire du maïs.

```
Analysis of Variance Table

Response: elgmais
      Df  Sum Sq  Mean Sq  F value  Pr(>F)
sol      3 0.063333 0.0211111      5.7 0.02191 *
Residuals 8 0.029630 0.0037037
```

Annexe XXI : Test de Newman et Keuls pour l'élongation racinaire du maïs.

```
$groups
  trt  means  M
1 Sol1 0.4666667 a
2 Sol2 0.3777778 ab
3 Sol3 0.3333333 ab
4 Sol4 0.2666667 b
```

Annexe XXII : Test de Kruskal-Wallis pour l'élongation racinaire de la laitue.

```
Kruskal-Wallis rank sum test

data:  elgglaitue by sol
Kruskal-Wallis chi-squared = 4.5911, df = 3, p-value = 0.2043
```

Résumé :

Le présent travail a pour objectifs de tester l'efficacité de quelques techniques biologiques dans la décontamination d'un sol contaminé par les hydrocarbures par le biais de l'évaluation des paramètres biologiques.

Les résultats obtenus ont montré que les indicateurs biologiques de la qualité du sol présentaient des valeurs faibles après bioaugmentation, biostimulation et phytoremédiation, ce qui signifie que ces dernières ont dégradé de façon plus efficace les hydrocarbures dans le sol par rapport à l'atténuation naturelle.

La phytoremédiation s'est avérée être la plus efficace vu la faible quantité résiduelle d'hydrocarbures et la disparition de certaines fractions de ceux-ci.

Les mots clés : les hydrocarbures, phytoremédiation, biostimulation, bioaugmentation, atténuation naturelle, la qualité biologique du sol.

Abstract:

This study aims to test the effectiveness of some biological techniques in the decontamination of hydrocarbon polluted soil by evaluating the biological parameters.

The results showed that the biological indicators of soil quality had low values after bioaugmentation, biostimulation and phytoremediation. It means that these techniques have been able to degrade hydrocarbons more efficiently than the natural attenuation.

The phytoremediation was the most effective among the applied techniques since it left less hydrocarbons in the soil, with dissipation of some of them.

Key words: hydrocarbons, phytoremediation, biostimulation, bioaugmentation, natural attenuation, soil biological quality.