

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERRI DE TIZI OUZOU
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES
AGRONOMIQUES
DÉPARTEMENT D'AGRONOMIE



THÈSE DE DOCTORAT Es SCIENCES

Spécialité : science du sol

Présentée par :

Samira ALI AHMED

**Optimisation de quelques techniques de décontamination de sols
pollués aux hydrocarbures. Réalisation de bio-essais.**

Devant le jury composé de :

<i>M^{me} BOURBIA-MOUAS S.</i>	<i>Maitre de Conférences A</i>	<i>UMMTO</i>
<i>M^{me} SADOUDI-ALI AHMED D.</i>	<i>Professeur</i>	<i>UMMTO</i>
<i>M^r ABDESSELAM S.</i>	<i>Professeur</i>	<i>Université de Batna</i>
<i>M^r DELLAL A.</i>	<i>Professeur</i>	<i>Université de Tيارت</i>
<i>M^r MASMOUDI A.</i>	<i>Professeur</i>	<i>Université de Biskra</i>
<i>M^{me} ASMANI K.</i>	<i>Maitre de Conférences A</i>	<i>UMMTO</i>

Soutenue le 03/03/2022

A ma famille

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à adresser mes vifs remerciements à Mme Sadoudi-Ali Ahmed D. Professeur à la FSBSA, pour son encadrement scientifique, ses orientations, ses précieux conseils et ses idées limpides qui m'ont été d'une grande utilité. Qu'elle trouve également ici l'expression de toute ma gratitude pour avoir été toujours à l'écoute malgré ses multiples engagements.

Mes remerciements s'adressent également à Mme Bourbia-Mouas S., MCA à la FSBSA, Mme Asmani K., MCA à la FSBSA, Mr Abdesselam S., Professeur à l'université de Batna, Mr Dellal A., Professeur à l'université de Tiaret et Mr Masmoudi A., Professeur à l'université de Biskra, pour m'avoir fait l'honneur de composer ce jury et pour avoir donné de leur temps pour lire et expertiser ce document.

Je ne saurai oublier de remercier aussi mes parents, mes frères et mes sœurs pour leur soutien et leurs encouragements.

Je tiens à remercier chaleureusement Mme Ali Ahmed C., MCB à la faculté du Génie de la construction pour son dévouement et son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Je remercie le responsable de la station-service de Boukhalfa pour nous avoir permis d'accéder à la station pour y effectuer nos expériences.

Mes remerciements vont aussi au responsable, aux ingénieurs et aux techniciens du laboratoire de Pédologie de l'INRF de Bâinem pour leur aide inconditionnelle à chaque fois que nous les avons sollicités.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude envers Mr Fellag H., Professeur à la faculté des sciences, pour m'avoir initiée à cet outil formidable qu'est le logiciel R, et Mme Krouchi F., Professeur à la FSBSA, pour m'avoir permis de faire cette formation.

Je remercie également Mr Houali K. Professeur à la FSBSA et Mme Megueni N., MCA à la FSBSA, pour leur aide.

Mes remerciements les plus sincères vont aussi à Mme Abrous H. ingénieur du laboratoire PSEMRVC, Mme Hadbi M., attachée de laboratoire au département de Biologie, Mme Bedad-Bedrici K. attaché de laboratoire à la FSBSA, les ingénieurs des laboratoires communs de pédologie ; Mme Yefsah R. et Mme Tabet N., d'analyses physico-chimiques ; Mme Lamri L. et Mme Lateb Z. et de microbiologie ; Mme Bouanem et Mme Guendouzi, ainsi que Mr Deguiche et Mme Astouati, pour leur aide dans la réalisation de ce travail.

Je remercie Mme Bouabdallah S., responsable des laboratoires et Mme Kara H. ingénieur de laboratoire à la faculté de Chimie, ainsi que les ingénieurs des laboratoires de Génie-civil pour leur contribution dans la réalisation de la partie pratique.

Enfin, je remercie toutes personnes ayant contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail.

Résumé

Ce travail a été entrepris afin d'optimiser les paramètres des techniques biologiques de décontamination des sols pollués aux hydrocarbures.

Les résultats montrent que les carburants ont modifié les propriétés du sol. La teneur en matière organique, l'humidité, la densité et le rapport C/N sont plus élevés dans le sol pollué. La biomasse microbienne, l'activité biologique et la perméabilité ainsi que le taux de germination des graines ont été réduits.

L'espèce végétale la plus tolérante vis-à-vis des carburants est la fève, et la souche bactérienne la plus performante dans la production de tensioactifs est *Pseudomonas aeruginosa*. C'est pourquoi, elles ont été utilisées respectivement dans la phytoremédiation et dans la bioaugmentation du sol.

L'optimisation mathématique a permis une utilisation rationnelle des matières par les solutions optimales calculées par le biais des AGs. Elle a montré que les concentrations de fertilisants et la durée de traitement par biostimulation pouvaient être revues à la baisse, présentant ainsi une économie de substances et de temps et évitant les risques de pollution qui peuvent en découler. La densité de la suspension de *P. aeruginosa* et la durée du traitement les plus élevées étaient les plus adéquates pour le traitement par bioaugmentation, car la souche utilisée est allochtone nécessitant un temps d'adaptation aux conditions du milieu. Les densités de semis préconisées pour la fève pouvaient être augmentées pour pallier la baisse de la densité des plants et de la biomasse occasionnée par la présence des carburants, assurant ainsi une meilleure efficacité de la phytoremédiation.

La présente étude a montré aussi la pertinence de l'utilisation des bio-essais comme indicateurs de la toxicité dans le sol et que les plantes ayant accumulé des hydrocarbures ont été valorisées par leur utilisation pour produire des biocarburants.

Mots-clés : sol pollué, carburants, optimisation, algorithmes génétiques, biodécontamination, bio-essais.

Abstract

This work was undertaken in order to optimize the parameters of biological techniques for hydrocarbon-polluted soils decontamination.

The results show that the fuels changed the properties of the soil. Its organic matter content, moisture, density and C / N ratio were higher in polluted soil. Microbial biomass, biological activity and permeability as well as seed germination rate were reduced.

The most fuel-tolerant plant species was the bean and the strain that performs best in the production of surfactants was *Pseudomonas aeruginosa*. This is why they have been used in soil phytoremediation and bioaugmentation, respectively.

The mathematical optimization allowed a rational use of materials by the optimal solutions calculated with the AGs. It has shown that the concentrations of fertilizers and the duration of treatment could be reduced, thus saving both substance and time and avoiding the risks of pollution which may result from it. The highest density of the suspension of *P. aeruginosa* and the highest duration were the most suitable for bioaugmentation treatment, since the strain used is allochthonous, requiring time to adapt to environmental conditions. The sowing densities recommended for the bean could be increased to compensate for the drop in plant density and biomass caused by the presence of fuels, thus ensuring better phytoremediation efficiency.

The present study has also shown the relevance of bioassays as indicators of toxicity in the soil and that plants which accumulated hydrocarbons have been valued by their use to produce biofuels.

Keywords : polluted soil, fuel, optimization, genetic algorithms, biodecontamination, bioassays

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	5
1. Pollution du sol	5
1.1. Sites et sols pollués	5
1.1.1. Définition des sites pollués	5
1.1.2. Evaluation du risque écologique des sites pollués	6
1.1.3. Bio-essais	6
1.1.4. Points finaux de mesure	6
1.2. Polluants du sol	7
1.3. Pollution du sol par les hydrocarbures	7
1.3.1. Définition et classification des hydrocarbures	8
1.3.2. Propriétés physico-chimiques des hydrocarbures	10
1.3.3. Sources de pollution des sols par les hydrocarbures	12
1.3.4. Comportement des hydrocarbures dans le sol	14
1.3.5. Impacts des hydrocarbures.....	21
2. Décontamination des sols pollués aux hydrocarbures	24
2.1. Procédés physiques	24
2.1.1. Méthodes physiques par évacuation	24
2.1.2. Méthodes physiques par piégeage	25
2.2. Procédés chimiques.....	25
2.3. Procédés thermiques.....	25
2.4. Procédés biologiques.....	26
2.4.1. Techniques de bioremédiation	26
2.4.2. Phytoremédiation	30
3. Algorithmes génétiques : nouveaux outils d'optimisation	35
3.1. Définition	36
3.2. But des algorithmes génétiques	37
3.3. Principe	37
3.3.1. Un principe de codage	38
3.3.2. Un mécanisme de génération	38
3.3.3. Une fonction à optimiser	38

3.3.5. Des paramètres de dimensionnement.....	38
3.4. Fonctionnement des algorithmes génétiques.....	38
3.4.1. Initialisation.....	38
3.4.2. Opérateur de croisement.....	39
3.4.3. Opérateur de mutation.....	39
3.4.4. Fonction d'évaluation.....	39
3.4.5. Opérateur de sélection.....	39
3.5. Application des algorithmes génétiques.....	40
3.5.1. Optimisation et prévision.....	40
3.5.2. Représentation de l'apprentissage.....	40
3.6. Représentation des résultats des AGs.....	40
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	41
1. Présentation du site d'étude.....	41
1.1. Localisation et description du site d'étude.....	41
1.2. Caractéristiques climatiques.....	42
1.3. Conditions climatiques pendant la période de l'essai.....	44
1.3.1. Températures.....	44
1.3.2. Précipitations.....	44
2. Caractérisation des sols.....	45
2.1. Matériel.....	46
2.1.1. Sol contaminé.....	46
2.1.2. Sol non contaminé.....	47
2.1.3. Matériel biologique.....	47
2.2. Méthodes.....	47
2.2.2. Analyses des sols.....	47
2.2.3. Analyse statistique.....	51
3. Sélection d'espèces végétales tolérantes aux carburants.....	51
3.1. Matériel.....	51
3.1.1. Sol.....	51
3.1.2. Matériel végétal.....	51
3.2. Méthodes.....	52
3.2.1. Mise en culture au laboratoire.....	52

3.2.2. Mise en culture in situ	54
3.2.3. Analyse statistique	55
4. Production de tensioactifs biologiques	55
4.1. Matériel	55
4.2. Méthodes	55
4.2.1. Culture des souches bactériennes	56
4.2.2. Analyse statistique	57
5. Optimisation mathématique des techniques biologiques de décontamination	57
5.1. Matériel	57
5.1.1. Sol	57
5.1.2. Fertilisants	58
5.1.3. Matériel végétal	58
5.1.4. Souche bactérienne	58
5.2. Méthodes	58
5.2.1. Traitement du sol pollué par biostimulation	58
5.2.2. Traitement par bioaugmentation du sol pollué	59
5.2.3. Traitement par phytoremédiation du sol pollué	59
5.2.4. Evaluation de l'efficacité des traitements	59
5.2.5. Méthodes mathématiques	60
6. Applications au laboratoire et in situ des solutions optimales	60
6.1. Matériel	60
6.2. Méthodes	61
6.2.1. Expérience de laboratoire	61
6.2.2. Expérience in situ	61
6.2.3. Combinaisons de techniques in situ	61
6.2.4. Analyses statistiques	62
7. Valorisation des plantes utilisées dans les essais en laboratoire	62
7.1. Matériel	62
7.1.1. Matériel végétal	62
7.1.2. Levure	63
7.2. Méthodes	63

7.2.1. Analyse des hydrocarbures dans les plantes	63
7.2.1. Production de bioéthanol	63
7.2.2. Evaluation de la production de l'éthanol	64

Chapitre III : Résultats et discussion.....65

1. Caractérisation du sol	65
1.1. Caractérisation de la pollution du sol	65
1.2. Propriétés physiques et chimiques	66
1.3. Qualité biologique du sol	68
1.4. Caractéristiques du sol pollué durant les trois années de l'expérimentation	69
1.5. Discussion	71
2. Sélection des plantes tolérantes aux carburants	73
2.1. Culture hors site	73
2.1.1. Taux de levée	73
2.1.2. Hauteur de la tige	74
2.1.3. Biomasse aérienne	75
2.1.4. Biomasse racinaire	75
2.1.5. Nombre de nodules	75
2.2. Culture sur site	76
2.2.1. Taux de levée	76
2.2.2. Hauteur de la tige	77
2.2.3. Biomasse aérienne	77
2.2.4. Biomasse racinaire	78
2.2.5. Nombre de nodules	78
2.3. Discussion	79
3. Production de tensioactifs	81
3.1. Tension superficielle	81
3.2. Indice d'émulsification E_{24}	82
3.3. Rendement de la production des tensioactifs	83
3.4. Discussion	83
4. Optimisation mathématique	84
4.1. Optimisation de la biostimulation	85

4.1.1. Activité biologique	85
4.1.2. Biomasse microbienne	85
4.1.3. Germination des graines	86
4.1.4. Optimisation mathématique	86
4.2. Optimisation de la bioaugmentation	91
4.2.1. Activité biologique	91
4.2.2. Biomasse microbienne	91
4.2.3. Germination des graines	92
4.2.4. Optimisation mathématique	92
4.3. Optimisation de la phytoremédiation	94
4.3.1. Activité biologique	94
4.3.2. Biomasse microbienne	94
4.3.3. Germination des graines	94
4.4. Discussion	97
5. Applications des solutions optimales	100
5.1. Résultats de la biostimulation	100
5.1.1. Essai en laboratoire	100
5.1.2. Essai de terrain	101
5.2. Résultats de la bioaugmentation	101
5.2.1. Essai en laboratoire	101
5.2.2. Essai de terrain	101
5.3. Résultats de la phytoremédiation	102
5.3.1. Essai en laboratoire	102
5.3.2. Essai de terrain	102
5.4. Combinaison des traitements	102
5.5. Discussion	103
6. Production de biocarburants	107
6.1. Résultats de la caractérisation des hydrocarbures dans les plantes	107
6.2. Résultats de la production des biocarburants	109
6.3. Discussion	109
Conclusion générale	111
Références bibliographiques	114

Liste des tableaux

Tableau 1. Compositions massiques des éléments pétroliers (Chitour, 1983).....	8
Tableau 2. Types d'hydrocarbures (Colin, 2000 ; Picot et Montandon, 2013).....	9
Tableau 3. Typologie simplifiée des principaux agents de contamination (Fattal, 2008).....	13
Tableau 4. Biodégradabilité des produits pétroliers (Fattal, 2008).....	17
Tableau 5. Micro-organismes capable de dégrader les hydrocarbures pétroliers (Saada et al., 2005).....	20
Tableau 6. Facteurs affectant les processus de biodégradation optimale (Delage et Schrefler, 2005).....	20
Tableau 7. Synthèse de quelques travaux sur la biostimulation de sols pollués par les hydrocarbures.....	28
Tableau 8. Synthèse de quelques travaux sur la bioaugmentation de sols pollués aux hydrocarbures.....	30
Tableau 9. Synthèse de travaux sur la phytoremédiation de sols pollués aux hydrocarbures...	33
Tableau 10. Etapes de transformation de la ligno-cellulose en éthanol (Grammont, 2006).....	35
Tableau 11. Résultats de l'analyse granulométrique des sols.....	67
Tableau 12. Effet des concentrations des fertilisants et de la durée du traitement sur l'activité et la biomasse microbiennes et sur le taux de germination des graines de maïs.....	69
Tableau 13. Régressions calculées pour le taux de germination en fonction des concentrations de fertilisants et de la durée du traitement.....	86
Tableau 14. Caractéristiques des solutions optimales du premier modèle.....	87
Tableau 15. Caractéristiques des solutions optimales du deuxième modèle.....	90
Tableau 16. Effet des densités de la suspension de <i>P. aeruginosa</i> et de la durée du traitement par bioaugmentation sur l'activité et la biomasse microbiennes et sur le taux de germination des graines de maïs.....	90
Tableau 17. Composition de la classe 1 du modèle du taux de germination en fonction de la	

densité de la suspension bactérienne et de la durée du traitement.....	91
Tableau 18. Effet des doses de semis de la fève et de la durée du traitement par phytoremédiation sur l'activité et biomasse microbiennes et sur le taux de germination des graines de maïs.....	94
Tableau 19. Composition de la classe 1 du modèle du taux de germination en fonction de la densité de semis et de la durée de la culture.....	95
Tableau 20. Composition de la classe 1 du modèle du taux de germination en fonction de la densité de semis et de la durée de la culture.....	97

Liste des figures

Fig. 1. Composition de l'essence (A) et du gasoil (B) (Marchal et al., 2003).....	10
Fig. 2. Schéma représentant les sources de pollutions dans une station-service (Piedrafita-Carnicer et Carnicer, 2013).....	14
Fig. 3. Processus influençant le devenir des hydrocarbures dans le sol (Maes et al., 2007).....	15
Fig.4. Triangle de la biodégradation (Suthersan, 1997).....	18
Fig.5. Schéma synthétisant les différentes formes de phytoremédiation (Chevrier, 2013).....	32
Fig.6. Voies de production de biocarburants de deuxième génération (Lemarchand, 2007).....	34
Fig. 7. Principe de l'opérateur de mutation.....	39
Fig.8. Carte géographique de la wilaya de Tizi Ouzou.....	42
Fig. 9. Image satellite de la station-service de Boukhalfa (Google maps, 2014)	42
Fig. 10. position de la station d'étude sur le climagramme d'Emberger	43
Fig. 11. Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gausсен de la station de Boukhalfa (2003-2014).....	43
Fig. 12. Températures moyennes, maximales et minimales mensuelles de la station de Boukhalfa pendant les saisons agricoles 2014-2015 (A) et 2015-2016 (B).....	44
Fig. 13. Précipitations moyennes mensuelles de la station de Boukhalfa pendant les saisons agricoles 2014-2015 (A) et 2015-2016 (B).....	45
Fig. 14. Schéma de la méthode d'échantillonnage adoptée.....	47
Fig. 15. Dispositif du test respirométrique.....	49
Fig. 16. Dispositif de la culture en pot des espèces végétales.....	53
Fig. 17. Dispositif de la culture des espèces tolérantes sur le site.....	54
Fig. 18. Etapes de l'isolement et de la purification des tensioactifs.....	56
Fig. 19. Dispositif d'application des traitements combinés in situ.....	62
Fig. 20. Quantité d'hydrocarbures dans les prélèvements de sol contaminé.....	65

Fig. 21. Comparaison des spectres IR du sol contaminé (SC) et du sol témoin (SNC).....	66
Fig. 22. Effet de la contamination sur les propriétés physiques et chimiques du sol.....	67
Fig. 23. Effet de la contamination sur les indicateurs de la qualité biologique du sol.....	68
Fig. 24. Variations des propriétés physiques et chimiques du sol (A) et des indicateurs biologiques de qualité (B) au cours des trois années de l'expérimentation.....	70
Fig. 25. Variation de la quantité d'hydrocarbures dans le sol entre les trois années de l'expérimentation.....	70
Fig. 26. Taux d'inhibition des paramètres végétatifs des plantes dans les essais hors site.....	74
Fig. 27. Taux d'inhibition de la nodulation des racines des Fabacées.....	76
Fig. 28. Taux de levée de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site.....	77
Fig. 29. Hauteur des tiges de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site.....	77
Fig. 30. Biomasse aérienne de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site.....	78
Fig. 31. Biomasse racinaire de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site.....	78
Fig. 32. Nombre de nodules de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site.....	79
Fig. 33. Tension de surface des moûts de fermentation des souches bactériennes.....	82
Fig. 34. Indice d'émulsification des tensioactifs produits par les souches bactériennes.....	82
Fig. 35. Rendement de la production de tensioactifs par les souches bactériennes.....	83
Fig. 36. Analyse en composantes principales. Distribution des Variables (A) et individus (B) pour le premier modèle. Distribution des Variables (C) et individus (D) pour le deuxième modèle.....	88
Fig. 37. Classes d'individus caractérisés par la durée du traitement et les concentrations du fertilisant azoté (A), ou par la durée du traitement et les concentrations du fertilisant phosphaté(B)...	89
Fig. 38. Analyse en composantes principales. Distribution des variables (A) et individus (B) pour le modèle de la bioaugmentation.....	92
Fig. 39. Classes d'individus caractérisés par la durée du traitement de bioaugmentation et la densité de la suspension bactérienne.....	93

Fig. 40. Analyse en composantes principales. Distribution des variables (A) et individus (B) pour le modèle de la phytoremédiation.....	96
Fig. 41. Classes d'individus caractérisés par la durée du traitement par phytoremédiation et la densité de semis de la fève.....	97
Fig. 42. Résultats de la quantité de C-CO ₂ , MB et GR après les essais de biostimulation (A), de bioaugmentation (B) et de phytoremédiation (C) de laboratoire et de terrain.....	101
Fig. 43. Comparaison du taux de germination après application sur site des solutions optimales des trois techniques de décontamination, de leurs combinaisons et de l'atténuation naturelle.	102
Fig. 44. Spectres IR des sols traités par atténuation naturelle (An), bioaugmentation (Ba), phytoremédiation (Ph) et biostimulation (Bs).....	104
Fig. 45. Spectres IR des sols traités par les combinaisons biostimulation-bioaugmentation, biostimulation (Bs+Ba+Ph), biostimulation-bioaugmentation (Bs+Ba), biostimulation-phytoremédiation (Bs+Ph), et bioaugmentation-phytoremédiation (Ba+Ph).....	105
Fig. 46. Spectre IR des plants de fève (F) et de pois (P) cultivés sur sol non contaminé (NC) et sur sol contaminé (C).....	108

Introduction générale

Le sol est une ressource limitée qui est menacée par une importante pollution causée par diverses substances (Baize et Jabiol, 1995).

Les polluants ou facteurs de pollution du sol sont très nombreux. Leur intensité et leurs effets sont changeants, dans le temps et dans l'espace. Les hydrocarbures sont parmi les plus répandus (Koller, 2004).

La pollution causée par les hydrocarbures pétroliers, principalement issus des stations-service, dans l'environnement terrestre et aquatique, présente un effet néfaste sur le sol, la faune et la flore (Thavasi et al., 2011).

Cette pollution est due principalement aux fuites des cuves de stockages, points de remplissages, ilots de pompes, etc., qui sont des sources importantes et répandues dans l'espace (Colin, 2000).

D'après les données fournies par NAFTAL en 2014, 84 stations-service sont implantées dans la wilaya de Tizi Ouzou, 18 sont étatiques et 66 font partie du secteur privé. La direction de l'agence distribue en moyenne 70 camions par jour au niveau de la wilaya et chaque station distribue 1 à 2 camions de 27m³ par jour. Ceci représente un risque potentiel important de pollution, c'est pourquoi le traitement des sols ainsi pollués est nécessaire.

De nombreuses techniques physiques, chimiques et thermiques ont montré leur efficacité dans la décontamination des surfaces polluées par les hydrocarbures. Certaines aboutissent même à la destruction de ces polluants, mais elles sont très coûteuses et ne préservent pas la qualité du sol, d'où l'intérêt de l'utilisation des techniques biologiques, qui sont peu coûteuses et protectrices de l'environnement (Koller, 2004).

La bioaugmentation, la biostimulation et la phytoremédiation sont les techniques de bases appliquées dans tous les procédés biologiques, soit seules ou en traitements combinés. Elles constituent une approche attractive de nettoyage des hydrocarbures pétroliers car elles sont simples à mettre en œuvre et applicables sur une large surface (Bento et al., 2005).

De nombreux travaux ont été publiés par Coulon et Delile (2003), Silva-Castro (2013), Suja et al. (2014), Wu et al. (2016), Roy et al. (2018), Bosco et al. (2019), Brzeczcz et al. (2020), Sist et al. (2020), sur l'application de la décontamination biologique des sols pollués aux hydrocarbures qui ont donné de bons résultats.

Toutefois, l'application de ces techniques avec un excès de matière peut s'avérer néfaste pour le sol. L'emploi de quantités excessives d'engrais dans le cadre de la biostimulation peut conduire à la contamination des eaux souterraines, des eaux de surfaces et à la pollution de l'air et sont toxiques pour les vers de terre et les micro-organismes du sol (Good et Beatty, 2011 ; Savci, 2012). Les engrais doivent être appliqués aux concentrations nécessaires dans le processus de bioremédiation. Ainsi, la détermination des concentrations optimales d'engrais inorganiques est une étape importante pour éviter les excès qui peuvent causer d'autres pollutions.

Par ailleurs, il serait intéressant que des paramètres comme la densité de la suspension bactérienne à utiliser dans le procédé de bioaugmentation soient optimisés car l'injection au sol d'un grand nombre de cellules bactériennes va créer un déséquilibre dans la structure de la microflore du sol. Selon Del Panno et al. (2005), l'analyse biologique a montré que les sols contaminés souffraient d'une perturbation à long terme. Le nombre de bactéries hétérotrophes qui a augmenté après le traitement par bioaugmentation n'est pas revenu au niveau du sol témoin 1 an après l'application du traitement.

La densité de semis des plantes à utiliser dans la phytoremédiation doit aussi faire l'objet d'une optimisation car les plantes cultivées sur un sol contaminé aux hydrocarbures subissent un stress dû à ces polluants, réduisant ainsi la densité des plants et leur croissance (Chaineau et al., 1997 ; Siddiqui et al., 2001 ; Haider et al., 2021).

La durée pendant laquelle ces traitements biologiques doivent être appliqués doit être, également, optimisée car l'objectif de l'application de ces techniques est d'accélérer l'atténuation naturelle. Ceci peut être fait en utilisant des algorithmes mathématiques pour optimiser un modèle de régression multiple (Huang et al., 2008). Des informations de base telles que la concentration en nutriments, la dose de semis, la densité de la suspension bactérienne et la durée du traitement sont nécessaires et doivent être déterminées.

Les algorithmes génétiques (AGs) sont considérés actuellement comme de puissants outils d'optimisation, même pour des problèmes complexes (Leardi, 2003 ; McCall, 2005 ; Ghaheri, 2015). Ils sont basés sur les mécanismes de la sélection naturelle et la génétique. Ils conjuguent une stratégie de « survie du plus fort » avec un échange aléatoire mais structuré d'informations. Pour un problème pour lequel une solution est inconnue, un ensemble de solutions possibles est créé au hasard. Ce groupe est appelé "population".

Les caractéristiques (ou variables à déterminer) sont ensuite utilisées dans des séquences de gènes qui seront combinées avec d'autres gènes pour former des chromosomes et ensuite des individus. Chaque solution est associée à un individu, et cet individu est évalué et classé selon sa ressemblance avec la meilleure, mais encore inconnue, solution au problème. On peut donc espérer, en combinant les caractéristiques de solutions performantes, obtenir des solutions plus efficaces encore (Cerf, 1996 ; Bäck, 1997 ; McCall, 2005).

Les AGs peuvent être utilisés pour résoudre le problème posé qui vise à déterminer les concentrations optimales d'engrais, la densité des bactéries, la dose de semis et le temps optimal nécessaire pour restaurer la qualité biologique d'un sol contaminé par les carburants.

Pour évaluer l'efficacité de chacune des combinaisons "dose-durée", densité de suspension-durée et dose de semis-durée qui ont été testées, des bio-essais peuvent être utilisés, car ils sont proches de la réalité écologique et ils rendent compte de la biodisponibilité des polluants plutôt que de leur quantité. Il s'agit d'utiliser des points finaux de mesures qui sont : le taux de germination, l'élongation racinaire, la biomasse microbienne et l'activité biologique. Les résultats donnés par l'optimisation mathématique doivent être confrontés aux résultats de laboratoire et de terrain obtenus après application des solutions optimales.

L'objectif principal de ce travail est d'optimiser les techniques biologiques de dépollution afin d'appliquer les quantités de matières nécessaires sans qu'il n'y ait ni excès ni déficit. Cette étude vise aussi à mettre en évidence les effets des carburants sur le sol afin de déterminer les corrections nécessaires pour un meilleur rendement de la décontamination, mais aussi à sélectionner les espèces végétales tolérantes et les souches adaptées qui sont aptes à produire des tensioactifs qui favorisent la désorption et la solubilisation des hydrocarbures, les rendant ainsi biodisponibles. Ce travail vise enfin à démontrer la pertinence des bio-essais comme indicateurs de toxicité.

Le présent travail porte sur l'optimisation mathématique de trois techniques biologiques de décontamination de sols pollués à savoir, la biostimulation, la bioaugmentation et la phytoremédiation afin de déterminer les optima des paramètres choisis. Des espèces végétales ainsi que des souches bactériennes seront testées afin de déceler les plus adaptées d'entre elles à cette pollution. Les techniques de décontamination ont été appliquées à un sol provenant de la station-service de Boukhalfa, dans la commune de Tizi Ouzou. C'est un sol pollué par les carburants (essence et gasoil). Des essais de terrain ont été menés pour valider les résultats

obtenus en laboratoire. Enfin, les plantes cultivées sur le sol pollué, qui ne peuvent pas être restituées au sol, seront utilisées pour produire des biocarburants.

Nous avons structuré la présente thèse en trois chapitres. Dans le premier sont présentées les concepts et les données liées à la pollution du sol par les hydrocarbures, les techniques biologiques de décontamination et l'optimisation mathématique par les algorithmes génétiques. Le deuxième chapitre comporte la présentation du site pollué, du matériel et des méthodes utilisés dans la partie expérimentale. Le troisième chapitre réunit les résultats obtenus dans les différentes étapes de l'expérimentation et leur discussion.

Enfin, une conclusion vient clôturer la thèse, elle est assortie de quelques perspectives de recherche.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

La pollution du sol par les hydrocarbures engendre des problèmes écologiques et sociaux significatifs (Thavasi et al., 2011). Elle est le plus souvent localisée dans des sites (Colin, 2000). La connaissance de ces polluants et de leur comportement dans les sols s'avère indispensable pour établir des stratégies de remédiation.

1. Pollution du sol

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine à travers des effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux d'énergies, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. (Ramade, 2011).

Les hydrocarbures sont les polluants les plus fréquemment rencontrés dans les sites pollués. Selon la base de données française sur les sites et les sols pollués, 40% des sites recensés présentent une pollution aux hydrocarbures (Basol, 2006).

1.1. Sites et sols pollués

En parlant de sites et de sols pollués, il conviendrait de les distinguer car la stratégie à appliquer pour l'évaluation du risque écologique est différente (Hunsaker et al., 1990).

1.1.1. Définition des sites pollués

Un site pollué est un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltration de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement. Dans ces sites, la pollution présente un caractère concentré, c'est à dire des concentrations souvent élevées sur une surface réduite. Elle diffère des pollutions diffuses, comme celles des pratiques agricoles ou des retombées atmosphériques (Rivière, 1998).

On parle de site pollué lorsque la contamination est locale, et de sols pollués lorsque la pollution est diffuse s'étalant sur plusieurs kilomètres (Rivière, 1998). Les points finaux à utiliser pour évaluer le risque ne sont pas les mêmes dans les deux situations (Suter et al., 2000).

1.1.2. Evaluation du risque écologique des sites pollués

L'évaluation du risque est l'opération systématique qui décrit et quantifie les risques associés à des produits dangereux, des opérations, des actions ou des événements. Elle consiste à déterminer les sources de pollution, l'exposition et les effets observés des substances sur les milieux et les systèmes biologiques (Rivière, 1998).

Pour étudier les effets d'une substance ou pour déceler la présence d'une pollution donnée, des bio-essais sont souvent utilisés.

1.1.3. Bio-essais

Les bio-essais sont des essais de laboratoire utilisés pour mesurer la toxicité des produits chimiques. Ils diffèrent des essais d'écotoxicité par le fait qu'ils soient réalisés sur un matériau provenant du site pollué. Ils sont particulièrement intéressants car ils sont proches de la réalité du terrain (Rivière, 1998). Les bio-essais constituent un outil de choix dans le domaine de l'évaluation des effets des polluants sur la composante biologique des écosystèmes, ils traduisent les teneurs analysées par des outils de la chimie conventionnelle en effets mesurables sur des variables biologiques chez des populations des organismes tests (Bessi et El Alami, 2009).

Les organismes les plus utilisés pour évaluer la toxicité dans le sol sont les microorganismes, les plantes, les invertébrés et les oiseaux. Brzeszcz et al. (2020) ont utilisé des bio-essais pour évaluer l'efficacité de la bioremédiation dans un sol pollué aux hydrocarbures. Ces essais ont porté sur la souche bactérienne *Vibrio fisheri*, et des espèces végétales telles que le cresson alénois *Lepidium sativum* et la moutarde blanche *Sinapis alba*.

1.1.4. Points finaux de mesure

D'après Rivière (1998), les paramètres les plus fréquemment mesurés sur les microorganismes peuvent être structuraux (biomasse, richesse taxonomique), ou fonctionnels (respiration, ammonification et nitrification, fixation azotée, dénitrification et activités enzymatiques). Chez les végétaux, les principaux points finaux utilisés pour évaluer la phytotoxicité sont la germination et l'élongation racinaire (Renoux, 1996). La toxicité sur les invertébrés du sol est mesurée par des essais de toxicité aiguë (mortalité) ou chronique (croissance et reproduction) (Garric, 2009). Les organismes les plus utilisés sont les vers de terre et les gastéropodes. Sur les oiseaux, des tests de toxicité aiguë et sub-chroniques sont utilisés en administrant la substance par voie orale ainsi que des essais sur la reproduction (Rivière, 1998).

Le suivi de l'évolution de la toxicité pendant un biotraitement ou l'évaluation de l'efficacité d'un traitement peuvent être réalisés par le biais d'analyses biologiques. Une étude de l'état de santé du milieu restauré, par des mesures pertinentes d'activités microbiologiques (respiration, activité enzymatique,...) renseigne sur l'intégrité de l'écosystème terrestre (Renoux, 1996).

1.2. Polluants du sol

La pollution du sol résulte de l'apport de polluants à partir d'une source identifiable, et ayant pour conséquence l'augmentation de leurs concentrations originelles (Maes et al., 2007). Le sol est dit contaminé lorsqu'une substance potentiellement dangereuse est introduite dans le milieu naturel, quelle que soit sa teneur (Jeannot et al., 2000).

Dans l'environnement, on trouve différents types de polluants comme les métaux lourds, les hydrocarbures, les HAP, les pesticides, etc. (Morel, 1996 ; Jeannot et al., 2000). Ces substances qui parviennent dans le sol peuvent être dangereuses pour les micro-organismes, les plantes, les animaux et l'être humain. Le comportement des polluants dans le sol est déterminé par leurs propriétés telles que leur dégradabilité chimique ou biologique (Bliefert et Perraud, 2001 ; Calvet, 2005).

Les hydrocarbures interviennent dans 80% des cas de pollution du sol, ils tendent à s'accumuler du fait de leur faible solubilité (Rollin et al., 2005). Ils constituent une classe de produits chimiques dangereux, et lorsqu'ils sont du type essence ou solvants, ils peuvent engendrer des risques d'explosion ou d'incendie en cas d'accumulation (Koller, 2004).

1.3. Pollution du sol par les hydrocarbures

La contamination des sols par les hydrocarbures est répandue à travers le monde, elle est due à l'utilisation intense du pétrole comme principale source d'énergie (Pulgarin, 2012). D'après Koller (2004), les hydrocarbures constituent une ressource énergétique essentielle pour l'économie depuis la révolution industrielle. Il s'agit de ressources non renouvelables et sont considérées comme des polluants organiques majoritaires des sols, du fait de leur utilisation massive depuis longtemps.

La pollution du sol par ces substances 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. Elle peut être ponctuelle, caractérisée par la présence locale d'une forte concentration d'hydrocarbures en raison de l'utilisation de ces produits (dans environ 70% des cas rencontrés) (Colin, 2000)

ou diffuse, issue de la dispersion puis de l'accumulation des hydrocarbures sur d'importantes surfaces (cas des HAP provenant des dépôts atmosphériques) (Girard et al., 2005).

1.3.1. Définition et classification des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés organiques, aux origines multiples qui ont un caractère ubiquiste dans l'environnement (Denys et Rollin, 2005). Ce sont des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène et dont la formule brute est C_nH_m (Fattal, 2008). Ils peuvent contenir aussi des atomes d'azote, d'oxygène et de soufre (Triffault-Bouchet et al., 2015). Ce sont des produits chimiques très importants pour l'humanité de par leur abondance ainsi que leur potentiel en énergie (Gaudu, 2014).

Selon Chitour (1983), les hydrocarbures sont constitués d'éléments divers dont les proportions sont variables (Tableau 1).

Tableau 1. Compositions massiques des éléments pétroliers (Chitour, 1983).

Composés	% massiques
Carbone	84 à 87 %
Hydrogène	11 à 14 %
Soufre	0,04 à 6 %
Azote	0,1 à 1,5 %
Oxygène	0,1 à 0,5 %
Métaux	0,05% à 0,015%


Les hydrocarbures sont souvent classés selon leur nature. Ils peuvent être saturés ou insaturés, linéaires, ramifiés ou cycliques (Le Corfec, 2011). On distingue trois grandes familles d'hydrocarbures présentées dans le tableau 2.

D'autres types d'hydrocarbures peuvent être rencontrés ; les résines et les asphaltènes. Ce sont des composés stables à très haut poids moléculaire (Fattal, 2008). Leur structure est mal connue du fait de leur composition chimique complexe à base de cycles aromatiques condensés et des métaux lourds à l'état de traces (Soltani, 2004).

Les hydrocarbures regroupent différents produits pétroliers (pétrole brut, kérosène, essences, fuel, lubrifiants, et huiles à moteurs). On définit les hydrocarbures par des familles de dérivés en fonction de leur utilisation, ces familles sont basées sur des coupes de raffinage pétrolier. Il

est possible de préciser le nombre d'atomes des molécules et leurs composants (Lemière et al., 2001).

Tableau 2. Types d'hydrocarbures (Colin, 2000 ; Picot et Montandon, 2013).

Famille	Désignation courante	Désignation officielle	Motif structurel	Formule brute
Saturés	Paraffines	Alcanes	Liaisons simples	C_nH_{2n+2}
	Naphtènes	Cyclanes	Cycle de 3 à 6 atomes de carbone	C_nH_{2n}
Insaturés	Oléfines	Alcènes	Liaison(s) double(s)	C_nH_{2n}
	Acétyléniques	Alcynes	Liaison(s) triple(s)	C_nH_{2n-2}
Aromatiques	Aromatiques	Monocyclique Polycyclique	Présence de cycle(s) benzénique(s)	

1.3.1.1. Carburants

Les carburants tels que l'essence et le gasoil sont stockés et vendus dans les stations-service. Il s'agit de mélanges complexes d'hydrocarbures pétroliers. Leur composition en hydrocarbures dépend de facteurs comme l'origine du pétrole brut soumis au raffinage et les conditions de raffinage.

En outre, divers additifs sont ajoutés en petites quantités (voire en traces) pour améliorer les propriétés techniques des carburants : produits antidétonants, anti oxydants, antigels, substituts du plomb et colorants (Muck, 2007).

1.3.1.2. Essences

D'après Marchal et al. (2003), les essences sont des liquides qui possèdent une grande densité d'énergie dont le nombre de carbone est compris entre 4 et 10.

Dans la composition des essences, il existe environ 230 hydrocarbures différents (fig. 1).

1.3.1.3. Gasoil

C'est l'un des principaux produits de distillation du pétrole brut (l'intervalle de sa distillation est compris entre 180 et 380°C). Il est, de même composé des trois classes fondamentales d'hydrocarbures (fig. 1). Il contient 2000 à 4000 fractions d'hydrocarbures qui ne peuvent être totalement séparées par chromatographie en phase gazeuse (Marchal et al., 2003).

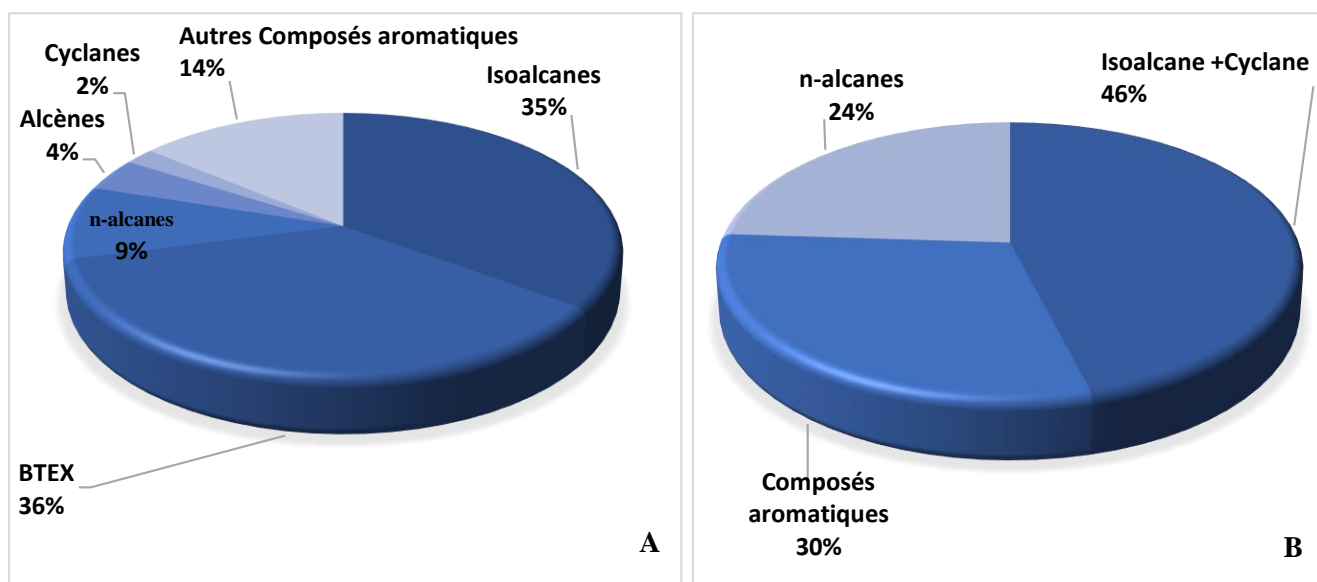


Fig. 1 : Composition de l'essence (A) et du gasoil (B) (Marchal et al., 2003).

1.3.2. Propriétés physico-chimiques des hydrocarbures

1.3.2.1. Solubilité

La solubilité indique la tendance d'une substance à la mobilisation par lessivage lors d'épisodes pluvieux, par ruissellement ou inondation (Colin, 2000).

1.3.2.2. Viscosité

Selon Colin (2000), la viscosité influe directement sur la perméabilité du matériau poreux au produit pur et régit donc son écoulement en phase à travers les zones non-saturées et saturées. Elle influence l'aptitude d'un fluide à l'infiltration et à la circulation dans le sous-sol. Plus la viscosité est élevée, plus le déplacement des hydrocarbures sera lent (Lemière et al., 2001).

1.3.2.3. Point d'éclair

Il est défini comme la plus basse température à laquelle les fractions d'hydrocarbures s'enflamment lorsqu'elles sont soumises à une étincelle. Certaines essences ont des points d'éclair à -4°C alors que le mazout a un point d'éclair aux alentours de 55°C (Fattal, 2008).

1.3.2.4. Pression de vapeur

D'après Colin (2000), la frontière entre un composé volatil et un composé non volatil peut être établie, selon la pression de vapeur, de la façon suivante :

- ✓ composé très volatil si $P_v > 1,5 \text{ KPa}$
- ✓ composé volatil si $0,5 < P_v < 1,5 \text{ KPa}$
- ✓ composé peu volatil si $0,1 < P_v < 0,5 \text{ KPa}$
- ✓ composé très peu volatil si $P_v < 0,1 \text{ KPa}$

1.3.2.5. Densité

La densité d'un hydrocarbure contrôle fortement sa vitesse d'infiltration dans le sol. Elle varie avec la longueur des chaînes carbonées. La plupart des hydrocarbures de C5 à C26 s'accumulent sélectivement en surface de la nappe phréatique (densité < 1) (Lemière et al., 2001). La quasi-totalité des hydrocarbures sont plus légers que l'eau. Pour les produits les plus courants la densité varie de 0,7 à 0,9 (Fattal, 2008).

1.3.2.6. Coefficient de partage carbone organique-eau (Koc)

Ce coefficient renseigne sur l'aptitude des substances à s'adsorber aux matrices. Il est d'autant plus élevé que le sol est riche en carbone. Selon Saada et al. (2005), plus la molécule d'hydrocarbure est lourde, plus elle aura tendance à se lier à la phase solide du sol, car elle sera peu mobile. Selon Scriban (1999), la rétention des hydrocarbures est proportionnelle à la teneur du sol en argile.

1.3.2.7. Coefficient de partage octanol-eau (Kow)

Ce coefficient rend compte de l'aptitude des hydrocarbures à s'accumuler dans les organismes vivants. D'une façon générale, on estime qu'il y a bioaccumulation lorsque $\log K_{ow}$ est supérieur à 3 (Ramade, 2011).

1.3.2.8. Demi-vie (DT50)

La demi-vie représente le temps nécessaire pour que la moitié de la quantité d'une substance se dissipe. Elle est utilisée en général pour estimer la biodégradabilité des substances. D'après

Dommergues et Mangenot (1970), la dégradation des substances dépend de leur composition chimique, leur solubilité, leur consistance, leur toxicité et leur concentration dans le sol. La biodégradation des hydrocarbures est d'autant plus faible que la chaîne des aliphatiques est longue et ramifiée et que le nombre de cycles des aromatiques est élevé (Saada et al., 2005).

1.3.3. Sources de pollution des sols par les hydrocarbures

Les hydrocarbures présents dans l'environnement proviennent généralement d'une pollution pétrolière ou de la pétrochimie, d'usines à gaz, de certaines industries chimiques ou industries mécaniques (Saada et al., 2005).

Selon Colin (2000), la pollution des sols par les hydrocarbures peut avoir des origines diverses : les huiles de vidanges, les fuites des vieilles citernes de fuel et les fuites des carburants lors du remplissage, du stockage et lors de la distribution, les déchets des usines de traitement du pétrole, les boues de curage des fossés qui sont rejetées sur le sol.

Les HAP peuvent émerger à partir de processus naturels comme les feux de forêt ou par des activités anthropiques qui sont les principales causes de la pollution par ces derniers. Ils parviennent au sol par les retombées atmosphériques (Pulgarin, 2012).

Le tableau 3 résume les principales propriétés des hydrocarbures ainsi que leurs provenances.

➤ Cas d'une station-service :

Les produits pétroliers, notamment dans les stations-services, sont parmi les principales sources de pollutions du sol par différentes voies (fig. 2) à cause des déversements des hydrocarbures lors du remplissage des cuves de stockage de la station ou de la distribution de carburant, lors d'une fuite dans les réservoirs ou dans les canalisations entre les citernes et les îlots de pompes c'est une pollution ponctuelle (Colin, 2000 ; ADEME, 2009).

La contamination des sols par les carburants constitue un des risques majeurs pour l'environnement.

Tableau 3. Typologie simplifiée des principaux agents de contamination (Fattal, 2008)

Famille de polluants	Principales propriétés	Exemples	Activités généralisées
Hydrocarbures courants	<ul style="list-style-type: none"> -Plus légers que l'eau -Biodégradables -Solubilité variable -Volatils -Viscosité variable -Adsorption variable 	<ul style="list-style-type: none"> -Essences -Gazole -Fioul domestique -Carburants aviation -Pétrole brut -Naphta -solvants 	<ul style="list-style-type: none"> -Stations-service -Dépôts de stockage -Installations de transport (oléoducs, fer, route, voie maritime) -Raffineries -Transport (fer, route) -Usines de peintures
Hydrocarbures lourds	<ul style="list-style-type: none"> -Densité variable (en général plus lourds que l'eau) -Peu biodégradables -Peu solubles -Peu volatils -Visqueux -Adsorption forte -Goudrons de houille 	<ul style="list-style-type: none"> -Fiouls lourds -Goudrons de pétrole - Créosotes -Certaines huiles de coupes 	<ul style="list-style-type: none"> -Chaudières industrielles -Centrales thermiques -Usines à gaz -Raffineries -Traitement du bois -Usinage des métaux
Hydrocarbures halogènes aliphatiques	<ul style="list-style-type: none"> Denses Peu biodégradables Relativement solubles Volatils Fluides Adsorption faible 	<ul style="list-style-type: none"> -Nombreuses formules dont les plus courantes sont : TCE, TCA, PCE, chloroforme. 	<ul style="list-style-type: none"> -Traitement de surface -Ateliers mécaniques -Industries -Nettoyage à sec

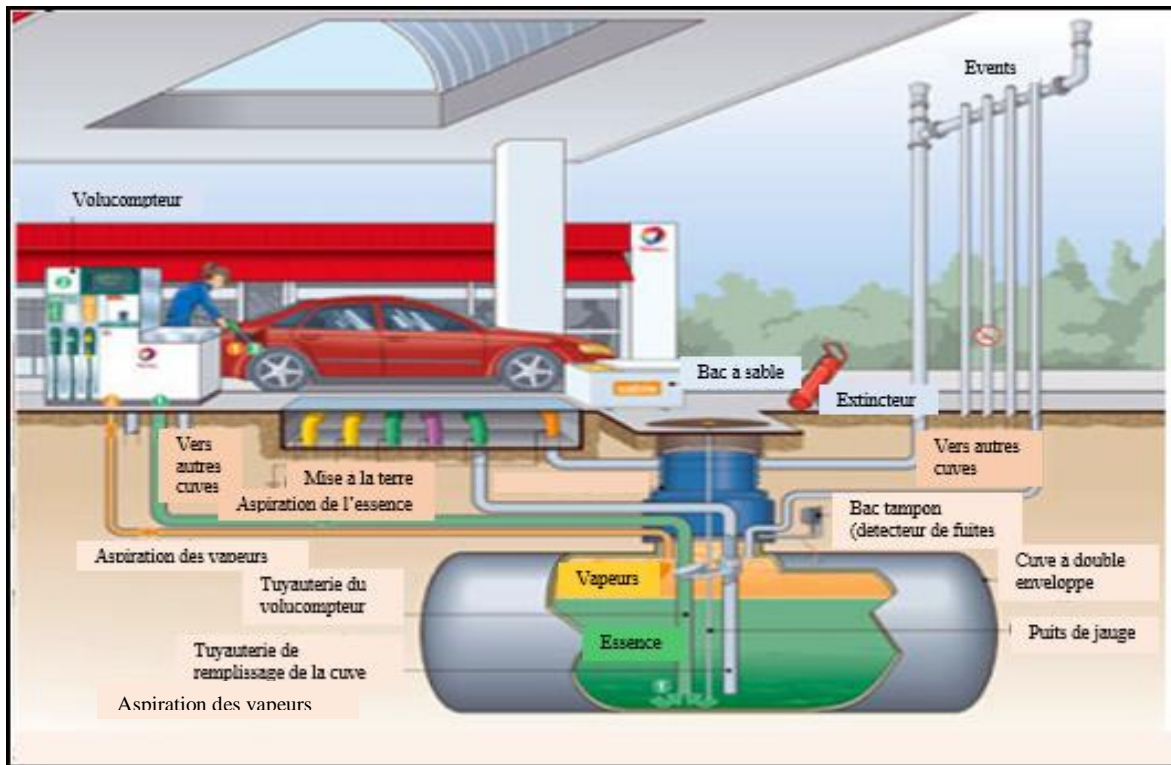


Fig. 2. Schéma représentant les sources de pollutions dans une station-service (Piedrafita-Carnicer et Carnicer, 2013).

1.3.4. Comportement des hydrocarbures dans le sol

Le comportement des polluants dans le sol est déterminé par leurs propriétés telles que leur dégradabilité chimique ou biologique (Bliefert et Perraud, 2001). Selon Koller (2004), le cheminement des hydrocarbures dans le sol dépend de plusieurs paramètres tels que la teneur en eau du milieu, la végétation, la température, la texture du sol, ainsi que la viscosité et la complexité du mélange (fig. 3).

1.3.4.1. Volatilisation

Le transfert des hydrocarbures du sol vers l'atmosphère se fait par volatilisation, ce qui engendre la diminution de la concentration des hydrocarbures dans le sol (Koller, 2004). Ce mécanisme dépend de la pression de vapeur c'est à dire le composé sera volatil lorsque la pression de vapeur est élevée.

Les propriétés du sol jouent aussi un rôle dans la volatilisation des hydrocarbures. En effet, plus l'humidité du sol est grande plus le volume des pores disponibles pour le passage des vapeurs est faible, et donc moins la volatilisation sera importante. Dans un sol sableux, les pores ont un diamètre important, ce qui favorise de plus grands transferts de masse de vapeurs vers l'atmosphère et donc une plus grande atténuation contrairement au sol argileux (Saada et al.,

2005). La volatilisation est un phénomène qui touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, température ...) (Mattei, 1995).

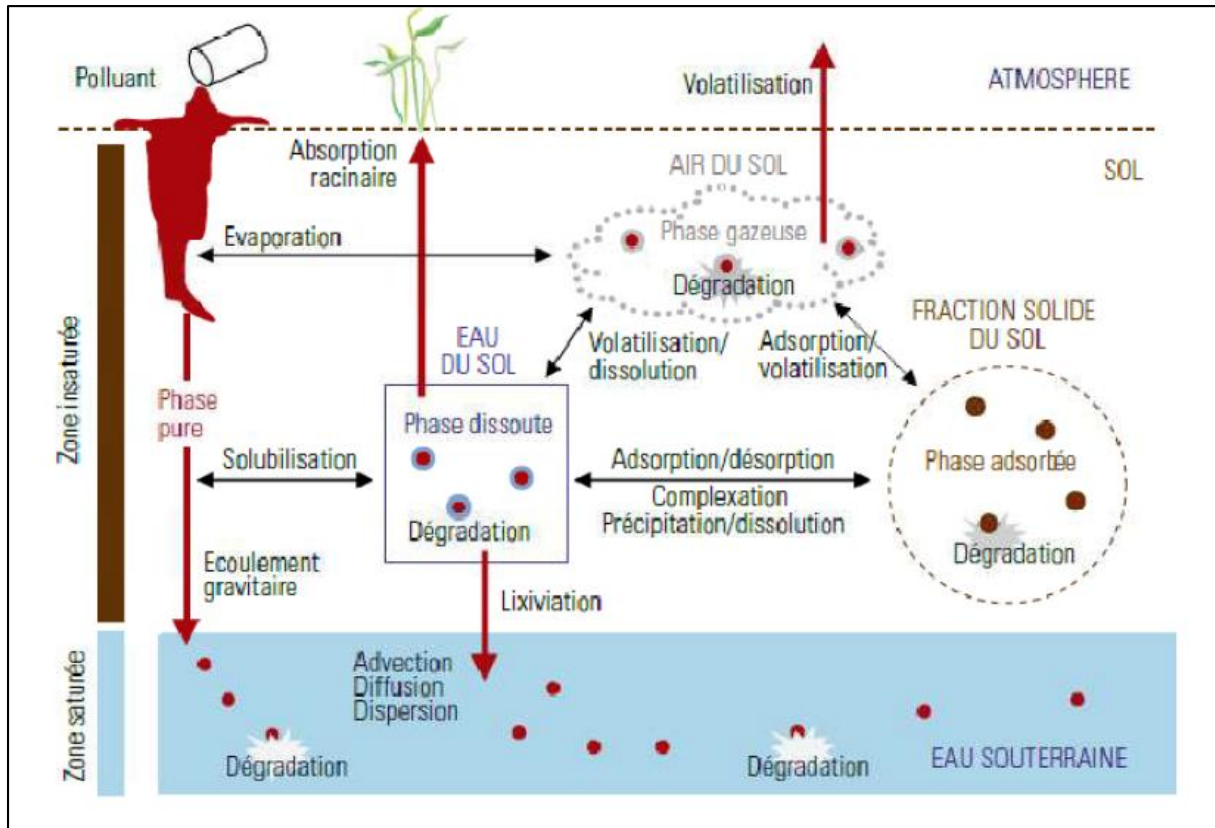


Fig. 3. Processus influençant le devenir des hydrocarbures dans le sol (Maes et al., 2007).

1.3.4.2. Solubilisation

La solubilisation détermine la tendance d'une substance à se dissoudre dans l'eau. Plus la solubilité est grande, plus la substance sera susceptible de se dissoudre dans les eaux souterraines et à migrer loin de la zone source. Les polluants les plus solubles sont en général plus facilement biodégradables (Saada et al., 2005).

La solubilité des hydrocarbures dans le sol dépend de leur nature et leur poids moléculaire. Les composés légers sont relativement solubles, par contre, les produits plus lourds sont très peu solubles. Les hydrocarbures solubilisés s'accumulent dans le sol et peuvent être absorbés par les plantes, et ensuite, ils seront transférés dans la chaîne alimentaire. La solubilisation joue un rôle important dans la détermination du degré de dispersion et de migration des hydrocarbures, ainsi que leur degré d'exposition aux microorganismes responsables de la dégradation biologique (Bergue et Mérienne, 1986). Certains composés solubles se dissolvent au contact de l'eau, ce qui rend impossible leur récupération.

Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement, ils sont difficiles à éliminer et sont absorbés par le végétal (Chocat, 2004).

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée (Mattei, 1995).

1.3.4.3. Adsorption

L'adsorption est la propriété qu'ont certains corps solides de retenir les molécules d'autres corps à leur surface. La quantité d'hydrocarbures adsorbés est fortement liée aux propriétés du sol, et à l'hydrophobicité du composé. Plus l'humidité est importante plus la quantité de pores occupés par la phase aqueuse est grande, et donc plus le volume de pores disponibles pour retenir les hydrocarbures contenus dans le sol est faible. L'argile possède une surface spécifique élevée et donc adsorbe facilement les polluants organiques (Saada et al., 2005). La fixation des polluants organiques est déterminée par leur solubilité, leur masse moléculaire et leurs caractères lipophiles, ainsi que leur concentration et les propriétés du sol (Koller, 2004). Le degré d'adsorption est directement lié au contenu en carbone organique du sol ; plus le milieu est riche en matière organique, plus il est favorable aux mécanismes de l'adsorption (Saada et al., 2005).

1.3.4.4. Dégradation

C'est la transformation de la molécule de base. Elle peut être biotique ou abiotique.

1.3.4.4.1. Dégradation abiotique

La dégradation abiotique peut être physique ou chimique. Les réactions de photo-oxydation physiques, d'oxydoréductions et d'hydrolyse chimique sont les trois processus principaux de cette dégradation (Saada et al., 2005).

La photolyse est la décomposition chimique (oxydation) de substances sous l'action de la lumière. Elle n'a évidemment lieu qu'en surface des milieux d'exposition (sols, eaux et végétaux) (Nowak et al., 2003). Les réactions d'oxydo-réductions sont plus souvent catalysées par des constituants inorganiques divers. Ce mécanisme est relativement important et permet une nette diminution des HAP dans le sol (Laurent et al., 2005). L'hydrolyse a lieu dans les phases aqueuses des milieux. Il s'agit de l'action de l'eau sur un polluant, consécutive à la dissociation ionique de l'eau (Nowak et al., 2003).

1.3.4.4.2. Dégradation biotique

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries (Vogel et Ballerini, 2001). C'est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un hydrocarbure en différents sous-produits, par l'action des micro-organismes (Saada et al., 2005), il en résulte généralement une diminution de la concentration du polluant (Nowak et al., 2003). C'est l'un des mécanismes conduisant à l'élimination des hydrocarbures (Soltani, 2004).

La dégradation des hydrocarbures se fait dans des conditions aérobies et anaérobies par des microorganismes, principalement des bactéries et /ou des champignons. En effet, les hydrocarbures constituent une source alimentaire pour les bactéries (Fattal, 2008).

Dans la biodégradation aérobie, les quantités d'éléments nutritifs et d'oxygène doivent être suffisantes pour que le processus puisse transformer la totalité du carbone présent. Lorsque la dégradation est complète, les produits rejetés par l'activité microbienne sont l'eau et le dioxyde de carbone (Colin, 2000).

La biodégradation anaérobie a lieu en milieu réducteur afin d'éliminer des composés organiques. Les bactéries utilisent le SO_3 comme accepteur d'électrons (au lieu de l'oxygène dans le cas du traitement aérobie), et les produits finaux sont surtout le méthane ou l'acide sulfhydrique ; ceci dépendant du composé organique initial (Colin, 2000). Le taux de biodégradabilité de quelques hydrocarbures est donné dans le tableau 4.

Tableau 4. Biodégradabilité des produits pétroliers (Fattal, 2008)

Produits pétroliers	Biodégradabilité
Essence	90-100%
Kérosène	80-100%
Gasols	60-85%
Fiouls lourds	10-20%
Lubrifiants	<50%
Asphaltes et bitumes	Négligeable
Pétrole brut	30-70%

Les essences et les gasols sont composés des mêmes classes d'hydrocarbures mais leur degré de biodégradabilité diffère du fait que les gasols soient constitués majoritairement

d'hydrocarbures plus lourds (iso-alcanes et alcanes ramifiés) alors que les essences sont constituées majoritairement de BTEX et autres aromatiques légers (Marchal et al., 2003). En règle générale, plus la masse molaire ou le nombre de cycle augmente, plus la vitesse de biodégradation diminue (Saada et al., 2005).

1.3.4.4.3. Facteurs influençant la biodégradation

Selon Girard et al. (2005), la biodégradation des hydrocarbures est influencée par plusieurs facteurs dont les principaux sont : la nature du sol, la structure, la concentration et les caractéristiques physico- chimiques des polluants ainsi que les paramètres environnementaux (Fig. 4).

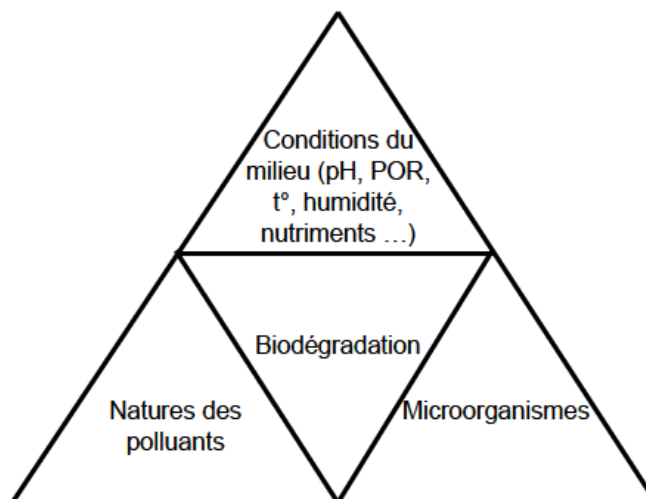


Fig.4 : Triangle de la biodégradation (Suthersan, 1997)

➤ **Structure et texture du sol**

La taille des pores et les propriétés de l'eau et de l'air dans ces pores sont des facteurs spécifiques de chaque sol. Les particules élémentaires du sol sont généralement liées entre elles formant des agrégats plus ou moins volumineux groupés en unités structurales du sol. En effet, les agrégats tendent à diminuer l'activité microbienne dans le sol de manière indirecte par ralentissement de la diffusion de l'oxygène et l'apport des nutriments à l'intérieur de l'unité structurale et par la protection mécanique des substrats qu'elle renferme (Girard et al., 2005).

➤ **Composition et nature du polluant**

La biodégradabilité des hydrocarbures est très fortement dépendante de leur composition. A une température déterminée, les fractions légères sont plus susceptibles d'être biodégradées que les fractions lourdes (Soltani, 2004). Selon le même auteur, les hydrocarbures pétroliers

diffèrent par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible. D'après Saada et al. (2005), la dégradation des hydrocarbures aliphatiques est d'autant plus faible que la chaîne carbonée est longue et ramifiée. Les hydrocarbures aromatiques les plus biodégradables sont ceux qui contiennent moins de 3 cycles benzéniques.

➤ **Facteurs environnementaux**

La température peut avoir un effet marqué sur la dégradation des hydrocarbures. En effet, la température influence l'état physique des hydrocarbures, ainsi que la composition et l'activité de la communauté microbienne qui se reflète sur le taux de dégradation des hydrocarbures (Atlas, 1981).

Selon Soltani (2004), l'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable.

La présence de nutriments inorganique (N, P) est indispensable pour une meilleure biodégradation (Girard et al., 2005). Les micro-organismes exigent pour leur croissance des nutriments qui doivent se trouver en quantités suffisantes dans le milieu.

L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Il est connu que les faibles humidités, inférieures à 2%, limitent la vitesse de biodégradation (Davis et Madsen, 1996). Inversement, des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz et générer des conditions de limitation de transfert d'oxygène et donc de limitation du métabolisme microbien aérobie (Ballerini, 1999).

Le pH est aussi un facteur important pour la biodégradation des hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons est favorisée par un pH proche de la neutralité (Leahy et Colwell, 1990).

➤ **Facteur microbiologique**

La présence dans le sol de souches capables de dégrader les hydrocarbures est un indispensable. Plusieurs souches bactériennes dégradant les hydrocarbures ont été recensées. Dans le tableau 5 sont cités les principaux micro-organismes qui dégradent les hydrocarbures pétroliers.

Tableau 5. Micro-organismes capable de dégrader les hydrocarbures pétroliers (Saada et al., 2005).

Benzène	<i>Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginasa, Acinetobacter, Nocardia sp.</i>
Toluène	<i>Bacillus sp., Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginasa, Pseudomonas sp.</i>
Ethyl-benzène	<i>Pseudomonas putida, Pseudomonas sp.</i>
Xylènes	<i>Pseudomonas putida, Pseudomonas sp.</i>
Naphtalène	<i>Pseudomonas putida.</i>
Alcanes	<i>Pseudomonas oleovorans, Methanosarcina barkeri.</i>

Les hydrocarbures à faibles poids moléculaires sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et, par conséquent, leur concentration très élevée dans les phases aqueuses (Colin, 2000). L'action toxique du polluant peut provoquer un ralentissement de l'activité de la microflore du sol (Girard et al., 2005). Pour une dégradation optimale, certaines conditions doivent être réunies (tableau 6).

Tableau 6. Facteurs affectant les processus de biodégradation optimale (Delage et Schrefler, 2005)

Facteur	Commentaires
Microorganismes	Microorganismes naturels sont satisfaisants Des conditions environnementales appropriées doivent être fournies
Toxicité	Degré de toxicité non élevé
Oxygène	Conditions aérobies désirées
Accepteurs d'électrons	O ₂ (conditions aérobies) ; NO ₃ ⁻ et SO ₄ ²⁻ (conditions anaérobies)
pH du sol	5,5-8,5(dégradation optimale)
Nutriments	Azote, phosphore et autres nutriments exigés pour la croissance microbienne
Températures	Biodégradation favorisée à des températures entre 25 et 37°C

1.3.5. Impacts des hydrocarbures

Le sol étant le support indispensable aux animaux, aux végétaux terrestres et à l'Homme et toute pollution de celui-ci retentira sur la flore, la faune et sur l'Homme lui-même (Koller, 2004).

Les hydrocarbures constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes, génotoxiques, mutagéniques ou tératogéniques. Ils représentent une menace pour la santé publique (Claxton, 2015).

Le type d'hydrocarbures, la durée de contact, la quantité et surtout le niveau de toxicité, influent sur l'importance de l'impact. Les hydrocarbures légers sont plus toxiques que les hydrocarbures lourds, ils sont généralement plus abondants dans les hydrocarbures déversés (Fattal, 2008).

1.3.5.1. Impacts sur les propriétés physiques du sol

Les études élaborées pour déceler l'impact des hydrocarbures sur les propriétés physiques du sol ne sont pas nombreuses. Toutefois, des observations intéressantes ont été faites par certains auteurs.

La présence des hydrocarbures dans le sol modifie légèrement sa structure. Les hydrocarbures enrobent les particules minérales et assurent leur dispersion (Rouquerol et al., 1987).

La contamination du sol par les hydrocarbures augmente sa densité (Koller, 2004). Les hydrocarbures provoquent aussi une augmentation de l'humidité qui est plus élevée de 2% dans un sol pollué que dans un sol non pollué, mais diminuent sa mouillabilité (Bergue et Mérienne, 1986).

1.3.5.2. Impacts sur les propriétés chimiques du sol

La présence des hydrocarbures affecte aussi les propriétés chimiques du sol. Ils provoquent, notamment, une augmentation de la concentration des éléments traces tels que le manganèse, le zinc, le fer et le plomb (Chaîneau et al., 1997), une augmentation de la conductivité électrique et de la teneur en certains minéraux (potassium et calcium). Ils engendrent aussi une diminution de la teneur de certains éléments minéraux (azote et phosphore) (Chaîneau et al., 1996) et du pH (Chaîneau et al., 1997 ; Njuko et al., 2009 ; Zahermand et al. 2020), conduisant généralement à une légère acidification du sol (2 à 3 dixièmes), qui traduit l'apparition de faibles quantités d'acides résultant de l'oxydation des *n*-alcanes, ou de celle des composés qui proviennent de la rupture des noyaux aromatiques (Bergue et Mérienne, 1986). Une augmentation de la teneur en

matière organique est constatée dans le sol contaminé, qui est due à l'apport des hydrocarbures qui sont des composés organiques (Ramade, 1992, Chaineau et al., 1996 ; Abdul-Ameer Ali, 2019), ainsi qu'une légère augmentation de la teneur en soufre (Bergue et Merienne, 1986). Aussi, une augmentation de la conductivité électrique a été observée par Chaineau et al. (1996) entraînant l'inhibition de la croissance de certaines plantes très sensibles à la présence des sels.

1.3.5.3. Impacts sur les propriétés biologiques du sol

L'apport des hydrocarbures dans le sol accroît de façon considérable l'activité microbienne. La modification de la microflore apparaît au bout du 54^{ème} jour après le déversement des hydrocarbures (Oudot, 1975). Rouquerol et ses collaborateurs (1987) ont avancé que l'imprégnation des sols en hydrocarbures a pour effet global une multiplication intense de la microflore (les champignons, les bactéries et les levures). Selon Alrumman et al. (2015), la contamination par les hydrocarbures inhibe les activités enzymatiques dans le sol. Par ailleurs, Sakshi et al. (2019) notent que les hydrocarbures réduisent la diversité au sein des populations microbiennes. De leur côté, Li et al. (2021) ont constaté que des concentrations de l'ordre de 2,5 % à 3,0 % (p/p) de diesel dans le sol réduisaient les types et le nombre de bactéries dans et détruisaient les communautés microbiennes responsables du cycle de l'azote.

Les effets des hydrocarbures sur l'activité biologique du sol dépendent de leur nature ; de leur concentration dans le sol et d'autres facteurs liés au milieu (Duchaufour, 2001). Selon le même auteur, les hydrocarbures, s'ils sont incorporés au sol en quantité limitée (moins de 2% de la couche superficielle 0-15cm), n'exercent pas d'action dépressive vis-à-vis des microorganismes du sol ; mais ils exercent une action nocive indirecte ; les composés humiques sont enrichis en lipides et deviennent à leur tour hydrophobes et difficilement biodégradables.

L'étendue de l'inhibition de l'activité microbienne augmente significativement avec l'augmentation des niveaux d'hydrocarbures (Alrumman et al., 2015).

Les hydrocarbures à faibles poids moléculaires sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et par conséquent leur concentration très élevée dans les phases aqueuses (Colin, 2000) car ils exercent un effet solvant sur les membranes (Morgan et al., 1989).

1.3.5.4. Impacts sur les végétaux

Le sol se comporte comme un vecteur de la pollution pouvant atteindre la végétation de surface (Colin, 2000). D'après Chaineau et al. (1997), un effet phytotoxique des hydrocarbures a été

observé à travers la diminution du taux de germination (Siddiqui et al. 2001, Haider et al., 2021), les retards de croissance et la diminution du rendement (Henner, 1999 ; Somtrakoon et Chouychai, 2013).

Selon Koller (2004), les hydrocarbures inhibent le développement de certains végétaux d'où le terme « phytotoxicité » des hydrocarbures. Cette toxicité se manifeste par une inhibition de la germination des graines et/ou celle de la croissance végétative qui a un impact sur le rendement en matière sèche.

Le contact entre les hydrocarbures et la surface foliaire des végétaux entraîne des dégâts qui vont dépendre de la nature du produit lui-même et de la dose appliquée (Bergue et Mérienne, 1986).

I-3-5-5-Impacts sur l'animal et l'Homme

Les hydrocarbures sont susceptibles d'induire l'apparition de cancers chez les organismes qui leurs sont exposés par inhalation, ingestion, ou par contact. Les principaux hydrocarbures cancérigènes sont les HAP. Ces derniers, une fois introduits dans l'organisme vivant, passent dans les réseaux trophiques, et présentent divers processus de bioaccumulation voire de bioamplification. La présence des substituants alkyles dans leurs molécules augmente leur cancérigénicité et leur halogénéation accroît leur toxicité aiguë pour les espèces animales (Ramade, 1992).

Les HAP sont les plus toxiques en raison de leur potentiel cancérigène et mutagène. Seize d'entre eux sont classés comme substances polluantes prioritaires par l'USEPA (Gabet, 2004). Les hydrocarbures aromatiques monocycliques ont des effets hématologiques et immunologiques. Le benzène peut provoquer des troubles neurologiques chez l'Homme, le styrène peut altérer l'appareil génito-urinaire et le phénol serait toxique pour le foie et les reins (Colin, 2000).

Les alcanes peuvent provoquer des brûlures œsophagiennes et gastriques suite à une exposition à long terme. L'éthylène peut entraîner des troubles des fonctions visuelles, une diminution de la pression artérielle et une diminution de la fréquence cardiaque (Picot et Montandon, 2013).

2. Décontamination des sols pollués aux hydrocarbures

La décontamination est un ensemble de procédés consistant à épurer ou tout au moins à isoler un milieu ayant été exposé à une pollution chronique ou récurrente qui l'a rendu inutilisable

pour des activités domestiques, agricoles ou industrielles. Le traitement concerne des terres excavées ou des sols encore en place (Koller, 2004).

Les techniques de décontamination ont pour objectif de traiter des produits ou des résidus qui constituent des sources de pollution, afin d'en diminuer, voire supprimer, le caractère polluant et ainsi réhabiliter le site (Colin, 2000).

Il existe trois modes d'application des traitements selon Girard et al. (2005) :

Le traitement sur site : implique l'excavation des terres mais celles-ci sont traitées sur le site qui possède une unité de décontamination

Le traitement in situ : se réalise sur le site sans bouger les terres polluées ; pour cela, on pratique des extractions, stabilisations ou encore des dégradations.

Le traitement hors site : consiste à évacuer les terres, déchets et eaux polluées pour les acheminer vers un centre de dépollution. Lorsque la pollution est trop difficile à traiter, la solution ultime consiste à décaper la couche de terre polluée et à l'enfouir en CET.

Les sols pollués peuvent être soumis à des traitements chimiques, physiques, thermiques ou biologiques. Ces derniers sont jugés rentables et efficaces contre l'élimination des hydrocarbures (Mi Jin et al., 2013).

2.1. Procédés physiques

Ce sont les méthodes les plus largement utilisées. Leur principe consiste à utiliser des fluides, présents dans le sol ou injectés comme vecteur pour transporter la pollution vers des points de concentration et d'extraction.

Ces procédés consistent à séparer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire. Les procédés d'extraction, de lavage et de confinement sont les plus souvent utilisés (Scriban, 1999).

2.1.1. Méthodes physiques par évacuation

Elles reposent sur l'extraction des polluants du sol. Les sols contaminés extraits seront stockés sous contrôle, lavés, concentrés ou dépollués. Ces méthodes sont applicables de façon préliminaire à une méthode de traitement complémentaire (Girard et al., 2005).

2.1.2. Méthodes physiques par piégeage

Ces techniques ne font qu'immobiliser les polluants en les confinant ou en les stabilisant. C'est une technique de stabilisation qui peut consister à introduire dans le sol une substance fixatrice qui n'altère pas les propriétés de la terre et ne modifie pas sa fertilité (Colin, 2000 ; Girard et al., 2005).

2.2. Procédés chimiques

Les procédés chimiques utilisent des réactifs pour détruire les polluants, les transformer en des composés moins toxiques et plus facilement biodégradables ou modifier leurs caractéristiques (mobilité, toxicité) (Colin, 2000).

Ils ont pour but de détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement ; et ceci par l'intermédiaire de réactions chimiques se produisant entre le polluant et le réactif ajouté (oxydation-réduction, adsorption-désorption, ajustement du pH et échange d'ions) (Koller, 2004). Ils généreront des composés moins toxiques (Lecomte, 1998).

Ils utilisent les propriétés chimiques des polluants pour les rendre inertes, les détruire (oxydation, etc.) ou les séparer du milieu pollué (surfactants, etc.) à l'aide de réactions appropriées (Saada et al., 2005).

2.3. Procédés thermiques

Les traitements thermiques utilisent la chaleur pour dégrader les contaminants présents dans les sols contaminés (Crone, 2013). Ils sont efficaces pour une gamme très large de produits et représentent une option courante à ce jour dans les filières de la décontamination (Koller, 2004). Les méthodes de traitements thermiques peuvent être appliquées sur site ou hors site (Lecomte, 1998).

Deux techniques ex situ sont utilisées, l'incinération et la désorption thermique. Elles sont employées pour la décontamination des sols pollués par les produits organiques. Ces technologies consistent à utiliser les hautes températures pour réduire les polluants en CO₂ et H₂O (Lecomte, 1998).

L'incinération se réalise en deux étapes ; une première à 400°C, dite de volatilisation et une seconde dite de destruction à une température supérieure à 1000°C. L'incinération est la seule technique qui détruit réellement les polluants (Lecomte, 1998). Selon Girard et al. (2005), les terres les plus contaminées sont traitées par l'incinération. La désorption thermique utilise des températures plus basses (250 à 500°C) (Lecomte, 1998).

2.4. Procédés biologiques

Les techniques non biologiques sont lourdes à mettre en œuvre, leur coût est élevé et les terres traitées sont transformées en un résidu stérile. En effet, Colombano et ses collaborateurs (2010) ont signalé que les techniques physiques, chimiques et thermiques présentaient plusieurs inconvénients, tels que le coût élevé d'excavation et de transport, l'emploi de solutions parfois toxiques pour l'environnement, la consommation énergétique très importante, le traitement d'une petite surface de sol à chaque mise en place, la réduction de la fertilité, ainsi que la mort des populations de micro-organismes et organismes vivants du sol. C'est pourquoi, des techniques biologiques curatives, développées ou en développement, sont utilisées car elles permettent de maintenir les propriétés du sol.

La remédiation biologique des sols semble être une méthode d'intérêt du point de vue économique et écologique. La biodégradation peut permettre la minéralisation du polluant, et donc sa disparition. Ces techniques sont particulièrement adaptées pour le traitement des sols pollués aux hydrocarbures (Verdin et al., 2004).

Les procédés biologiques exploitent les propriétés d'un organisme vivant pour réaliser l'opération de dépollution. Ce sont des procédés de décontamination se basant sur l'extraction ou la dégradation du contaminant (Girard et al., 2005).

Les procédés biologiques permettent de dégrader les polluants par l'action d'organismes vivants (bactéries, champignon, plantes, etc.). La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone (Colin, 2000).

Il existe deux catégories principales de traitements biologiques : les techniques de bioremédiation qui utilisent les microorganismes, essentiellement les bactéries, et les champignons, et les techniques de phytoremédiation qui exploitent les propriétés des végétaux (Girard et al., 2005 ; Chevrier, 2013).

2.4.1. Techniques de bioremédiation

Ces techniques reposent essentiellement sur deux principes ; l'apport de nutriments ou autres substances afin d'accélérer la biodégradation des hydrocarbures, et l'augmentation du potentiel biologique du sol afin d'améliorer l'efficacité et le rendement de l'atténuation naturelle.

2.4.1.1. Biostimulation

La biostimulation est définie comme un type d'assainissement naturel qui peut améliorer la dégradation des polluants en optimisant les conditions du milieu telles que l'aération, l'ajout de

nutriments, le pH et le contrôle de la température. La biostimulation peut être considérée comme une technique d'assainissement appropriée pour l'élimination des polluants pétroliers dans le sol et nécessite l'évaluation à la fois des capacités de dégradation de la microflore autochtone et des paramètres environnementaux impliqués dans la cinétique du processus in situ (Margesin, et Schinner, 2001 ; Koller, 2004). L'objectif est de supprimer l'action de tout facteur limitant la biodégradation, permettant ainsi une activité maximale des microorganismes (Bertrand et al., 2011).

a. Avantages de la biostimulation

D'après Adams (2015), les principaux avantages de la biostimulation sont :

- ✓ éviter les coûts d'excavation et de transport ;
- ✓ la biodégradation sera effectuée par des microorganismes indigènes déjà présents qui sont bien adaptés à l'environnement ;
- ✓ permet aux additifs d'être facilement accessibles aux microorganismes ;
- ✓ l'ajout de nutriments favorise la croissance des microorganismes hétérotrophes.

b. Travaux de recherche sur la biostimulation

La biostimulation a été appliquée dans différentes situations de pollution du sol par les hydrocarbures. Le tableau 7 présente une synthèse de quelques travaux ayant porté sur cette technique.

2.4.1.2. Bioaugmentation

Le principe de la bioaugmentation consiste à apporter dans les sols une quantité plus importante de microorganismes pour accélérer le phénomène de biodégradation. Ce sont des microorganismes exogènes qui sont isolés, cultivés, et injectés en plus grande quantité dans le sol afin d'accélérer le rendement de la biodégradation, ou indigènes isolées du sol, multipliées puis réinjectées sur le site (Bertrand et al., 2011).

L'application de la bioaugmentation est essentielle dans le cas où les micro-organismes capables de dégrader les composés cibles ne sont pas présents dans la communauté naturelle ou si l'activité de la communauté naturelle est inhibée. La sélection des souches est fondée sur le principe que certains micro-organismes sont mieux adaptés que d'autres à certaines activités cataboliques et certains environnements (Koller, 2004).

Tableau 7. Synthèse de quelques travaux sur la biostimulation de sols pollués par les hydrocarbures

Auteur	Titre	Résultats
Margesin et Schinner (2001)	Bioremédiation (Atténuation naturelle et biostimulation) des sols contaminés par le diesel dans une zone alpine glaciaire.	Efficacité de la Biostimulation Réduction de 5% et 70% d'hydrocarbures dans le sol non fertilisé et fertilisé.
Seklemova et al. (2001)	Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel : field démonstration	Nutriments ajoutés sans aucun effet sur la décontamination des sols pollués car la contamination initiale par le diesel était trop élevée (2000, 4000 et 6000 mg kg ⁻¹)
Coulon et Dellile (2003)	Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-Antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons.	Efficacité de la biostimulation sur la croissance des bactéries indigènes d'un sol subantarctique contaminé Forte augmentation du nombre de bactéries hétérotrophes et spécifiques.
Bento et al. (2005)	Bioremédiation comparative des sols contaminés par le diesel par atténuation naturelle, biostimulation et bioaugmentation.	Une plus grande dégradation de la fraction légère (72,7%) et de la fraction lourde (75,2%) des hydrocarbures totaux dans les sols traités par bioaugmentation.
Tanee et Kinako (2008)	Comparative studies of biostimulation and phytoremediation in the mitigation of crude oil toxicity in tropical soil	Efficacité de la Biostimulation et phytoremédiation dans l'atténuation de la toxicité du pétrole brut sur le sol
Martínez - Álvarez et al. (2015)	Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica.	Efficacité de l'essai sur le terrain en Antarctique qui réduisait considérablement les niveaux de contamination par les carburants dans les sols
Al-Mailem et al. (2017)	Biostimulation des microorganismes indigènes pour la bioremédiation des microcosmes hyper salins huileux du Golfe d'Arabie en région koweïtienne.	Augmentation du nombre de microbes et de l'élimination du pétrole après traitement avec les cations et avec des vitamines. Efficacité des cations dans l'élimination du pétrole dans l'ordre : Fe ³⁺ (94%) > Ca ²⁺ (89%) > Mg ²⁺ (85%) > K ⁺ (82%) avec élimination de la majeure partie du pétrole. Elimination de 78% et 72% par traitement avec des levures commerciales et du sang animal sources de vitamines
Villalba Primitz et al. (2021)	Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from Carlini Station, Antarctica : effectiveness of different nutrient sources as biostimulation agents	Dégradation de 50% des hydrocarbures totaux en 50 jours dans les sols traités par biostimulation. Amélioration de la croissance des communautés microbiennes et changement de leur structure.

La souche la plus documentée est *Pseudomonas aeruginosa* capable de dégrader divers hydrocarbures. C'est une souche bactérienne ubiquitaire, Gram négative ayant des exigences nutritives peu importantes. La température de sa croissance se situe entre 30 et 37°C. Cette bactérie joue un rôle très important dans la dégradation des hydrocarbures, notamment les HAP (Cerniglia, 1992 et Yin et al., 2009 ; Agnelo et al., 2016).

Selon Matvyeyeva et al. (2014) et Peele Karlapudi et al., (2018), les bactéries produisant des tensioactifs biologiques sont capables de dégrader de façon efficace les hydrocarbures pétroliers et leurs produits de distillation. Ceci leur offre un avantage en cas de concurrence avec d'autres souches.

D'après Villaverde et al. (2019), l'ajout d'une solution de tensioactif à un sol pollué par les hydrocarbures peut provoquer une diminution significative de la période d'acclimatation des souches exogènes, en raison d'une augmentation de la fraction biodisponible de ces polluants.

a. Avantages de la bioaugmentation

Cadière (2016) a énuméré les avantages de la bioaugmentation comme suit :

- ✓ coûts de traitement réduits ;
- ✓ traitement d'une gamme diversifiée de polluants ;
- ✓ possibilité de préparer des microorganismes spécialisés ;
- ✓ capacité des microorganismes à vivre dans des conditions extrêmes (pH, oxygénation, concentrations élevées de polluant, etc.) ;
- ✓ nombreux microorganismes identifiés et caractérisés ;
- ✓ tests en laboratoire concluants.

C'est l'application de cette technique sur le terrain qui semble être complexe à cause des concentrations élevées de polluant, propriétés du terrain, conditions climatiques qui peuvent ralentir le processus. Il se pose également le problème de la difficulté à trouver des sites pilotes pour valider les travaux de laboratoire.

b. Travaux de recherche sur la bioaugmentation

De nombreux papiers scientifiques ont été publiés à propos de l'utilisation de la bioaugmentation dans la décontamination de sols pollués aux hydrocarbures. Le tableau 8 présente une synthèse de quelques travaux effectués sur l'utilisation de la bioaugmentation.

Tableau 8. Synthèse de quelques travaux sur la bioaugmentation de sols pollués aux hydrocarbures

Auteurs	Titre	Résultats
Straube et al. (1999)	Benche-scale optimisation of bioaugmentation strategies for treatment of soil contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons	Augmentation des capacités métaboliques des communautés bactériennes autochtones du sol. Dégradation de composés insolubles (HAP) rendus plus accessibles à ces communautés.
Nasseri et al. (2010)	Influence of bioaugmentation in biodegradation of PAHs-contaminated soil in bio-slurry phase reactor	dégradation du phénanthrène de 87.8%, 85.5% et 92.8% par les souches <i>Pseudomonas sp.</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et leur consortium respectivement.
Lebkowska et al. (2011)	Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native MO : field-scale processes in Poland	82%, 50% et 30% de diesel ont été dégradés par bioaugmentation en traitement répétée, unique sans traitement après 4 semaines
Prakash et Irfan (2011)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> is present in crude oil contaminated sites of Barmer Region (India)	La souche <i>P. aeruginosa</i> possède la capacité de dégrader le pétrole présent dans le sol.
Nisha et al. (2013)	Degradation studies on diesel oil using bacterial consortium isolated from oil-polluted soil.	Conditions optimales pour la dégradation du diesel par <i>Bacillus coagulans</i> : pH =7, T=37°C et faible volume de diesel (3,125g).
Sadoudi-Ali Ahmed et al. (2014)	Treatment of an oil polluted soil by injecting <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and produced rhamnolipid.	Réduction du taux d'hydrocarbure après 4 semaines dans le sol traité par bioaugmentation. Augmentation de la quantité de CO ₂ dégagé, et du taux de germination
Szulc et al. (2014)	The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil :Feasibility during field studies	Les résultats suggèrent que l'amélioration du potentiel de biodégradation par l'introduction de microorganismes possédant des gènes cataboliques pertinents est une stratégie réalisable pour améliorer l'efficacité de la bioremédiation au cours du traitement à long terme.
Villaverde et al. (2019)	Bioaugmentation of PAH-Contaminated soils with novel specific degrader strains isolated from a contaminated industrial Site. Effect of hydroxypropyl-β-cyclodextrin as PAH bioavailability enhancer	Aptitude des souches <i>Achromobacter xylosoxidans</i> 2BC8 et <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> JR62 à dégrader le pyrène avec des taux allant jusqu'à 57.5%. Réduction de la durée d'adaptation de ces souches par l'ajout d'un tensioactif.

2.4.2. Phytoremédiation

La phytoremédiation est un ensemble de technologies utilisant les plantes pour réduire, dégrader ou immobiliser des composés organiques polluants (naturels ou de synthèse) du sol, de l'eau ou de l'air, provenant d'activités humaines. Cette technique permet également de traiter des pollutions inorganiques (élément traces métalliques, radionucléides) (Schnoor et Cutcheron, 2003). La phytoremédiation est une technique de bioremédiation in situ définie par l'utilisation des plantes potentiellement associées à des communautés de microorganismes

(bactéries et champignons) pour dégrader, séquestrer ou stabiliser les contaminants présents dans le sol (Cunningham et Berti, 1993).

Le travail de la phytoremédiation, est principalement réalisé par les racines où se passent l'essentiel des processus. Le système racinaire peut développer une très grande surface qui constitue le lieu des interactions avec le sol.

Si l'on examine ce qui se passe au niveau de l'extrémité d'une racine, on constate que beaucoup de composés organiques, appelés exsudats, y sont libérés, ils servent de substrats aux micro-organismes présents. Autour de la racine, on observe une activité biologique particulièrement intense ce qui constitue ce que l'on appelle la rhizosphère (Morel, 1996), dans laquelle les bactéries ou les champignons développant des mycorhizes, ont la capacité de dégrader les composés organiques présents dans le sol.

Il a été démontré que lorsque certaines plantes étaient présentes sur un sol pollué par des composés organiques difficilement dégradables, cette biodégradation se faisait plus efficacement (Dabouineau et al., 2005).

2.4.2.1. Mécanisme de la phytoremédiation

Koller (2004) a décrit les quatre mécanismes permettant aux plantes l'élimination des polluants par phytoremédiation (fig.5).

➤ Phytoextraction

Elle consiste à utiliser, sur les sols contaminés, des plantes accumulatrices pour extraire, transporter et concentrer les polluants de l'eau ou du sol dans les parties récoltables de la plante. Pour que cette technique soit efficace, il faut que le polluant soit disponible pour les racines et que celles-ci puissent le tolérer et l'absorber.

➤ Phytostabilisation

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

➤ Phytovolatilisation

Ce mécanisme consiste à utiliser les plantes pour extraire les polluants puis les éliminer par évapotranspiration *via* les stomates des feuilles ou les tiges. Une fois volatilisés, les polluants se dispersent dans l'atmosphère à des concentrations qui, normalement, ne représentent plus un danger pour l'homme.

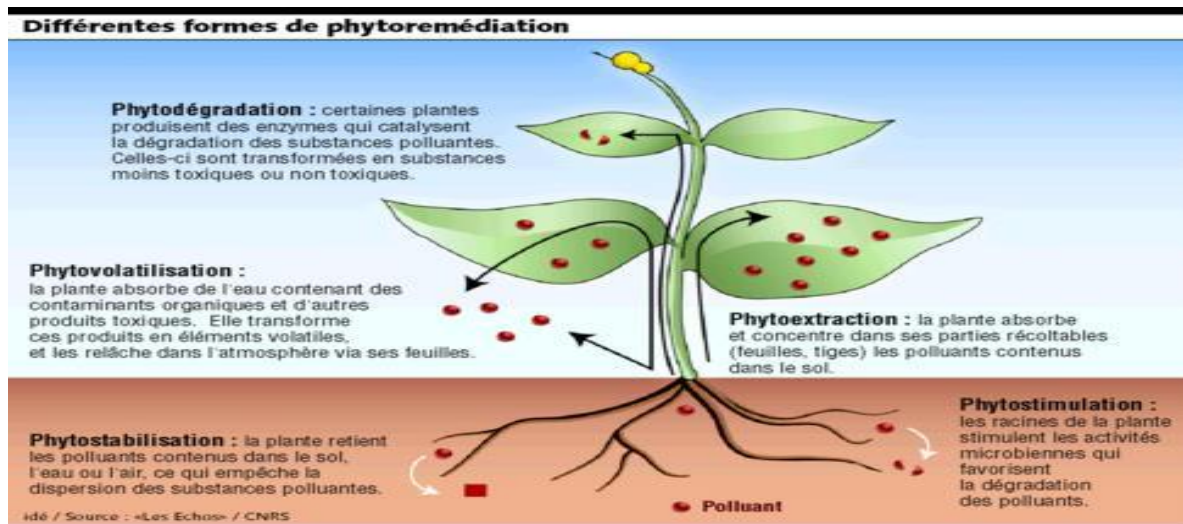


Fig.5 : Schéma synthétisant les différentes formes de phytoremédiation (Chevrier, 2013).

➤ Phytostimulation

La phytostimulation, aussi nommée rhizodégradation, consiste en la dégradation des contaminants présents dans la rhizosphère par l'activité microbienne qui est favorisée par la présence des plantes. Les plantes peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol de la rhizosphère par la sécrétion d'exsudats racinaires (Chevrier, 2013).

La phytodégradation fonctionne par l'absorption des polluants par la plante qui va les dégrader par son processus métabolique. Les polluants sont alors transformés en substances non toxiques (Origo et al., 2012).

2.4.2.4. Quelques travaux sur l'utilisation de la phytoremédiation dans la décontamination de sols pollués aux hydrocarbures

Plusieurs études ont été réalisées sur la phytoremédiation et ont souligné son efficacité dans la dépollution des sols contaminés par les hydrocarbures (tableau 9).

Tableau 9. Synthèse de travaux sur la phytoremédiation de sols pollués aux hydrocarbures

Auteurs	Titre	Résultats
Unterbrunner et al. (2007)	Plant and fertiliser effects on rhizodegradation of crude oil in two soils with different nutrient status	Réduction de la pollution du sol par l'espèce <i>Phragmites australis</i>
Atagana (2011)	Bioremediation of Co-contamination of Crude Oil and Heavy Metals in Soil by Phytoremediation Using <i>Chromolaena odorata</i> (L) King & H.E. Robinson	Réduction de 82% des hydrocarbures pétroliers et accumulation de métaux par <i>Chromolaena odorata</i>
Abid et al. (2014)	Phytoremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soil Using Sedge Species	Aptitude des Cypéracées à tolérer des concentrations élevées d'hydrocarbures (8-10%) avec une bonne croissance
Xu et al. (2014)	Successful bioremediation of an aged and heavily contaminated soil using a microbial-plant remediation strategy	Amélioration de la croissance du ray grass Augmentation de la diversité microbienne et de l'activité enzymatique Réduction de la quantité d'hydrocarbures
Ruley et al. (2019)	Assessment of plants for phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils in the Sudd Wetland of South Sudan	Les espèces <i>Hyparrhenia rufa</i> ; <i>Gossypium barbadense</i> ; <i>Oryza longistaminata</i> ; <i>Tithonia diversifolia</i> ; <i>Sorghum arundinaceum</i> efficaces dans la dégradation des hydrocarbures
Zuzolo et al. (2021)	Plant-Soil-Microbiota Combination for the Removal of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) : An In-Field Experiment	Potentiel de remédiation remarquable des Poaceae (<i>Festuca arundinacea</i> et <i>Dactylis glomerata</i>) et des Fabaceae (<i>Medicago sativa</i> et <i>Lotus corniculatus</i>)

2.4.2.3. Avantages de la phytoremédiation

Selon Saada et al. (2005), les avantages de la phytoremédiation sont multiples :

- ✓ les plantes limitent les transferts de polluants et les expositions ;
- ✓ la compétitivité en termes de coût par rapport aux autres techniques ;
- ✓ l'application générant peu de perturbations et d'impacts sur le sol ;
- ✓ la possibilité de réaliser des traitements de décontamination de grandes superficies ;
- ✓ une bonne intégration paysagère ;

- ✓ elle est visuellement attractive et a une perception généralement positive du public ;
- ✓ elle répond aux critères du développement durable (Morel, 1996).

Néanmoins, au cours de la phytoremédiation, les hydrocarbures peuvent être transférés dans les plantes à partir du sol par absorption racinaire ou par diffusion gazeuse ; ou encore par dépôt de particules atmosphériques (Rivière, 1998).

D'après Chaineau et al. (1996), les plantes peuvent accumuler des hydrocarbures dans leur biomasse. Ainsi, les végétaux utilisés dans la phytoremédiation des sols pollués ne peuvent être restitués au sol et constituent un déchet qui doit être valorisé.

L'utilisation de cette biomasse dans la production de biocarburants peut être une solution envisageable. En effet, les résidus des cultures peuvent être utilisés pour produire des biocarburants de deuxième génération, d'autant plus que ces parties (feuilles et tiges) possèdent une forte teneur en biomasse ligno-cellulosique (Anabelle, 2012).

Ces carburants végétaux, comme l'énergie solaire, éolienne, hydraulique et géothermique sont renouvelables (Debiton, 2011) et ont pour principal avantage la réduction des émissions du CO₂ par les véhicules (Tognang Mbendou, 2013).

Il existe deux voies de production de biocarburants de deuxième génération : la voie biochimique de production d'éthanol cellulosique et la voie thermochimique de production de diesel de synthèse (Fig.6).

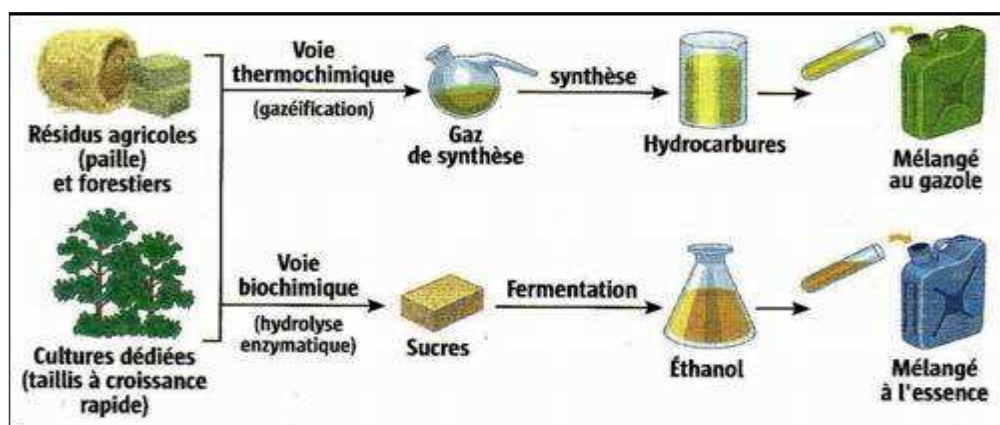


Fig.6. Voies de production de biocarburants de deuxième génération (Lemarchand, 2007).

La voie biochimique produit essentiellement de l'éthanol par hydrolyse puis fermentation de la ligno-cellulose (Grammont, 2006). Les étapes de cette transformation sont représentées dans le tableau 10.

Tableau 10. Etapes de transformation de la ligno-cellulose en éthanol (Grammont, 2006).

Etapes	Objectifs	Difficultés
Pré-traitement	Libérer la fraction hydrolysable de la BLC	Rompre la structure de la BLC, sans dégrader les sucres
Hydrolyse	Transformer hémicellulose et cellulose en sucres	Obtenir des meilleurs rendements sans dégrader les sucres
Fermentation	Transformer les sucres en éthanol	Transformer à la fois le glucose et les sucres en C5
Distillation Déshydratation	Séparer l'éthanol du mout	Obtenir la meilleure pureté Traiter les co-produits

Selon Ballerini, (2006) il existe deux types de fermentation :

- par les levures essentiellement *Saccharomyces cerevisiae* dont certaines souches sont utilisées industriellement pour la fermentation alcoolique. Elle ne peut pas utiliser la xylose comme source de carbone alors que d'autres espèces de levure peuvent convertir la xylose en éthanol (*Pichia stipitis* et *Candida shehatae*).

- par les bactéries qui convertissent le xylose en éthanol par plusieurs espèces de bactéries thermophiles comme *Thermoanaerobacter ethanolicus*, ou par des souches modifiées de *Bacillus stearothermophilus*. Des bactéries mésophiles comme *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca* sont capables de fermenter le pentose.

La fermentation est suivie de l'étape de distillation qui permet de récupérer l'éthanol en chauffant le mélange. Cependant, le mélange étant plus dilué que pour la première génération, le chauffage doit être plus important, et l'étape de distillation est, par conséquent, plus énergivore (Departe, 2010).

3. Algorithmes génétiques : nouveaux outils d'optimisation

L'optimisation est une branche des mathématiques cherchant à modéliser, analyser et résoudre analytiquement ou numériquement les problèmes. Elle consiste à maximiser une fonction sur un ensemble. On décompte plusieurs techniques et méthodes d'optimisation, mais la méthode

des algorithmes est très efficace en calcul. Les algorithmes génétiques (AG) se révèlent être des outils d'optimisation très puissants, même pour des problèmes complexes (Leardi, 2003 ; McCall, 2005 ; Ghaheri, 2015).

3.1. Définition

Les algorithmes génétiques sont des algorithmes d'optimisation s'appuyant sur des techniques dérivées de la génétique et des mécanismes d'évolution de la nature : croisements, mutations, sélections, etc. Ils appartiennent à la classe des algorithmes évolutionnaires.

En 1860 Charles Darwin publie son livre intitulé *L'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle ou la lutte pour l'existence dans la nature*. Dans ce livre, Darwin rejette l'existence "de systèmes naturels figés", déjà adaptés pour toujours à toutes les conditions extérieures, et expose sa théorie de l'évolution des espèces : sous l'influence des contraintes extérieures, les êtres vivants se sont graduellement adaptés à leur milieu naturel au travers de processus de reproductions. Au 20ème siècle, l'existence de mutations génétiques a été mise en évidence.

Les problèmes de traitement de l'information sont résolus de manière figée : lors de sa phase de conception, le système reçoit toutes les caractéristiques nécessaires pour les conditions d'exploitations connues au moment de sa conception ce qui empêche une adaptation à des conditions d'environnement inconnues, variables ou évolutives. Les chercheurs en informatique étudient donc des méthodes pour permettre aux systèmes d'évoluer spontanément en fonction de nouvelles conditions.

Dans les années 1960, John Holland étudie les systèmes évolutifs. En 1975, il introduit le premier modèle formel des algorithmes génétiques (*the canonical genetic algorithm AGC*) dans son livre *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. Ce modèle servira de base aux recherches ultérieures.

Dans les années 1990, une panoplie d'algorithmes génétiques transcrits en C++ a été programmée dans une librairie appelée GALib. Cette librairie contient des outils pour des problèmes d'optimisation en utilisant les AGs. Elle est conçue pour servir de support de programmation.

Les AGs sont fondés sur le néo-darwinisme, c'est -à-dire l'union de la théorie de l'évolution et de la génétique moderne. Ils s'appuient sur différentes techniques dérivées de cette dernière : croisements, mutation, sélection.

Les algorithmes génétiques sont des techniques d'optimisation stochastiques dont les fondements théoriques ont été définis par John-Holland. Ces algorithmes travaillent sur toute une population de chaînes, afin d'effectuer des opérations de recherche sur un domaine de possibilité plus important. C'est un outil reconnu robuste et performant pour l'optimisation de fonctions linéaires et non linéaires (Yousfi et Mansouri, 2004 ; Levasseur, 2007)

3.2. But des algorithmes génétiques

Les algorithmes génétiques appartiennent à la famille des algorithmes évolutionnistes. Leur but est d'obtenir une solution approchée à un problème d'optimisation, lorsqu'il n'existe pas de méthode exacte, ou lorsque la solution est inconnue, pour le résoudre en un temps raisonnable. Les AGs appliquent la notion de sélection naturelle à une population de solutions potentielles au problème donnée.

3.3. Principe des algorithmes génétiques

Les AGs travaillent sur toute une population de chaînes, afin d'effectuer des opérations de recherche sur un domaine de possibilité plus important. Ils diffèrent fondamentalement des méthodes classiques d'optimisation, par la technique de codage des paramètres et l'utilisation de règles de transition probabilistiques. La population initiale, choisie au hasard, est constituée d'individus représentant des solutions plus ou moins adaptées. Son évolution, d'une génération à une autre, se fait au moyen de trois opérateurs principaux : la sélection, le croisement et la mutation. Lorsque le codage des individus est du type réel, le codage et le décodage des paramètres n'est plus nécessaire. Le temps de calcul se trouve, ainsi, réduit car les paramètres apparaissent directement dans le chromosome. Pour un codage réel, plusieurs types de croisement sont possibles. La mutation représente le phénomène, bien qu'assez rare, relatif aux altérations qui peuvent affecter certaines informations héréditaires pendant la phase de reproduction (Christelle, 2007).

Un algorithme génétique recherche l'extremum ou les extrema d'une fonction définie sur un espace de données. Pour l'utiliser, on doit disposer selon Cormier (2005), des cinq éléments suivants :

3.3.1. Un principe de codage de l'élément de population. Cette étape associe à chacun des points de l'espace d'état une structure de données. Elle se place généralement après une phase de modélisation mathématique du problème traité. Les codages binaires ont été très utilisés à

l'origine. Les codages réels sont désormais largement utilisés, notamment dans les domaines applicatifs pour l'optimisation de problèmes à variables réelles.

3.3.2. Un mécanisme de génération de la population initiale. Ce mécanisme doit être capable de produire une population d'individus non homogène qui servira de base pour les générations futures. Le choix de la population initiale est important car il peut rendre plus ou moins rapide la convergence vers l'optimum global. Dans le cas où l'on ne connaît rien du problème à résoudre, il est essentiel que la population initiale soit répartie sur tout le domaine de recherche.

3.3.3. Une fonction à optimiser. Celle-ci retourne une valeur appelée fitness ou fonction d'évaluation de l'individu.

3.3.4. Des opérateurs permettant de diversifier la population au cours des générations et d'explorer l'espace d'état. L'opérateur de croisement recompose les gènes d'individus existant dans la population, l'opérateur de mutation a pour but de garantir l'exploration de l'espace d'états.

3.3.5. Des paramètres de dimensionnement. Il s'agit de la taille de la population, du nombre total de générations ou critère d'arrêt, des probabilités d'application des opérateurs de croisement et de mutation.

3.4. Fonctionnement des algorithmes génétiques

Pour un problème dont la solution est inconnue, un ensemble de solutions possibles est créé aléatoirement. Ce groupe est appelé « population ». Les caractéristiques (ou variables à déterminer) sont ensuite utilisées dans des séquences de gènes qui seront combinées avec d'autres gènes pour former des chromosomes puis des individus. Chaque solution est associée à un individu, et cet individu est évalué et classé selon sa ressemblance avec la meilleure solution au problème, mais encore inconnue. On peut donc espérer, en combinant les caractéristiques de solutions puissantes, obtenir des solutions encore plus efficaces (Cerf, 1996 ; Bäck, 1997 ; McCall, 2005).

Le fonctionnement d'un AG est basé sur plusieurs phases :

3.4.1. Initialisation

L'initialisation consiste à représenter les différents états possibles de la variable dont on cherche la valeur optimale sous forme utilisable pour un AG : c'est le codage. Cela permet d'établir une

connexion entre la valeur de la variable et les individus de la population, de manière à imiter la transcription génotype-phénotype qui existe dans le monde vivant.

3.4.2. Opérateur de croisement

Le croisement est le principal opérateur agissant sur la population des parents. Il permet de créer de nouveaux individus par l'échange d'information entre les chromosomes par le biais de leur combinaison.

3.4.3. Opérateur de mutation

Le rôle de cet opérateur est de modifier aléatoirement la valeur d'un gène dans un chromosome. Dans le cas du codage binaire, chaque bit $a_i \in \{0,1\}$ est remplacé par son complémentaire $a_i' = 1 - a_i$. Dans l'exemple de la figure 7, une mutation a eu lieu sur le troisième gène du chromosome *ch*, et elle a transformé ce gène de 1 en 0.

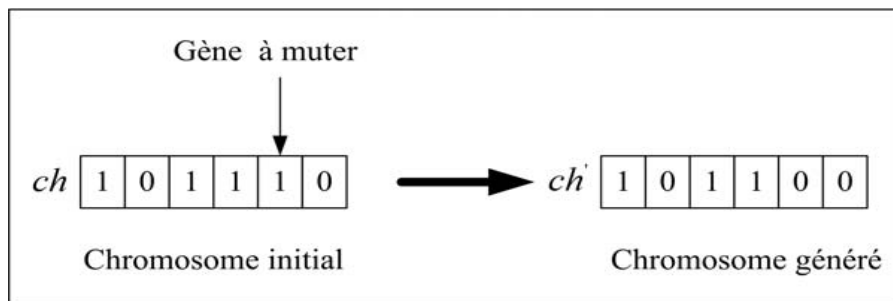


Fig. 7 : principe de l'opérateur de mutation

3.4.4. Fonction d'évaluation : Un algorithme génétique nécessite la définition d'une fonction rendant compte de la pertinence des solutions potentielles, à partir des grandeurs à optimiser. Nous la nommerons fonction d'adaptation f (ou fitness fonction en terminologie anglo-saxonne). Elle est souvent exprimée par la composition de deux fonctions g et h : $f = g \circ h$, avec \circ : loi de composition de fonctions g : fonction de transformation pouvant être linéaire, exponentielle, logarithmique, ou autre, et h : fonction objectif ou de coût, elle dépend de l'objectif recherché (Guenounou, 2009).

3.4.5. Opérateur de sélection

La sélection crée une population intermédiaire constituée de copies des individus de la population courante. En règle générale, le nombre de copies d'un individu est lié directement à la fitness relative de cet individu au sein de la population. Il existe plusieurs méthodes

heuristiques qui représentent la reproduction. La méthode la plus connue et la plus utilisée est la sélection par roulette biaisée (Cormier, 2005). Selon cette méthode, chaque chromosome est copié dans la nouvelle population proportionnellement à sa fitness. On effectue en quelque sorte, autant de tirages avec remise que d'éléments existant dans la population.

3.5. Application des algorithmes génétiques

Les AGs sont appliqués dans diverses disciplines, notamment dans l'économie et la finance. Sans prétendre à l'exhaustivité, on peut néanmoins classer ces applications autour de deux grands thèmes : l'utilisation des AGs comme outil d'optimisation et de prévision, et l'utilisation des AGs comme représentation de l'apprentissage.

3.5.1. Optimisation et prévision

Principalement, les AGs sont appliqués dans trois domaines : résolution numérique, économétrie et finance. Dans ces disciplines, les AGs sont utilisés comme de simples "algorithmes de calcul".

3.5.2. Représentation de l'apprentissage

Dans le domaine de l'économie, les AGs peuvent être utilisés pour représenter le processus adaptatif des anticipations et des choix des agents à l'évolution de leur environnement. Ils constituent alors une solution très intéressante pour un problème fondamental des modèles économiques avec des agents à rationalité limitée : la représentation de l'apprentissage des agents (Vallée et Yıldızoglu, 2001).

3.6. Représentation des résultats des AGs

Une fois qu'un ensemble de solutions (population) est identifié par l'algorithme génétique, une analyse statistique basée sur une analyse en composantes principales (ACP) est employée pour décrire cet échantillon. Cette méthode d'analyse factorielle permet de définir les directions principales d'un ensemble de points. En pratique, à partir d'un ensemble de solutions identifiées par l'AG, la matrice des corrélations est calculée. De cette matrice, les valeurs propres et les vecteurs propres sont déduits. Ils servent à identifier des corrélations entre les paramètres. De cette analyse, une classe est définie pour borner les solutions identifiées par l'AG. Cette classe représente les solutions du problème (Levasseur, 2007).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Les travaux de recherche entrepris dans le cadre de cette thèse ont pour objectif principal la détermination des conditions optimales d'application de techniques biologiques de décontamination d'un sol pollué aux carburants (biostimulation, bioaugmentation et phytoremédiation). Les solutions optimales calculées seront ensuite testées dans les conditions de laboratoire et in situ, en traitement isolé ou combiné.

Le travail expérimental comporte des parties réalisées au laboratoire et qui consistent à caractériser un sol contaminé aux carburants et un autre non contaminé afin de faire ressortir l'effet de ces polluants sur les propriétés physiques et chimiques du sol et à réaliser des bio-essais. Ceux-ci portent sur les propriétés biologiques du sol et sur la germination et la croissance des plantes. Des cultures en pot seront conduites pour sélectionner l'espèce végétale la plus adaptée à cette pollution afin de l'utiliser dans la phytoremédiation. Une culture de souches bactériennes sera ensuite réalisée pour tester leur aptitude à produire des tensioactifs en vue de leur utilisation dans la bioaugmentation car les tensioactifs rendent disponibles les hydrocarbures en les remobilisant et en les solubilisant.

D'autres expériences seront menées sur un site pollué au niveau d'une station-service. Une culture des espèces qui auront montré une tolérance vis-à-vis de ces polluants sera conduite pendant la deuxième année de l'expérimentation. Une application des solutions optimales et de leurs combinaisons a également été menée durant la troisième année de l'expérimentation.

1. Présentation du site d'étude

Notre travail a été conduit dans une station-service située à Boukhalfa dans la commune de Tizi Ouzou (fig. 8).

Le choix de cette station est justifié par la présence d'une pollution du sol par les carburants ; ce qui représente un risque pour l'environnement.

1.1. Localisation et description du site d'étude

Le site est localisé dans une station-service (latitude 36,7339414° et longitude 4,010508°) qui se situe à 5 Km à l'ouest du chef-lieu de la commune de Tizi-Ouzou sur la route nationale numéro 12 (fig.9). Elle a été créée en Février 2002. Elle s'étale sur une superficie d'un hectare et elle appartient au réseau de points de vente agréé par NAFTAL. Cette station est dotée d'une capacité de stockage de 40 m³ d'essence et de 400 m³ de gasoil. Elle est entourée de terres cultivées et non cultivées et sur sa droite passe un cours d'eau, ce qui représente un risque de pollution de l'eau et du sol environnant.



Fig. 8. Carte géographique de la wilaya de Tizi Ouzou
(www.pdfprof.com/PDF_Image.php?id=29097&t=26)

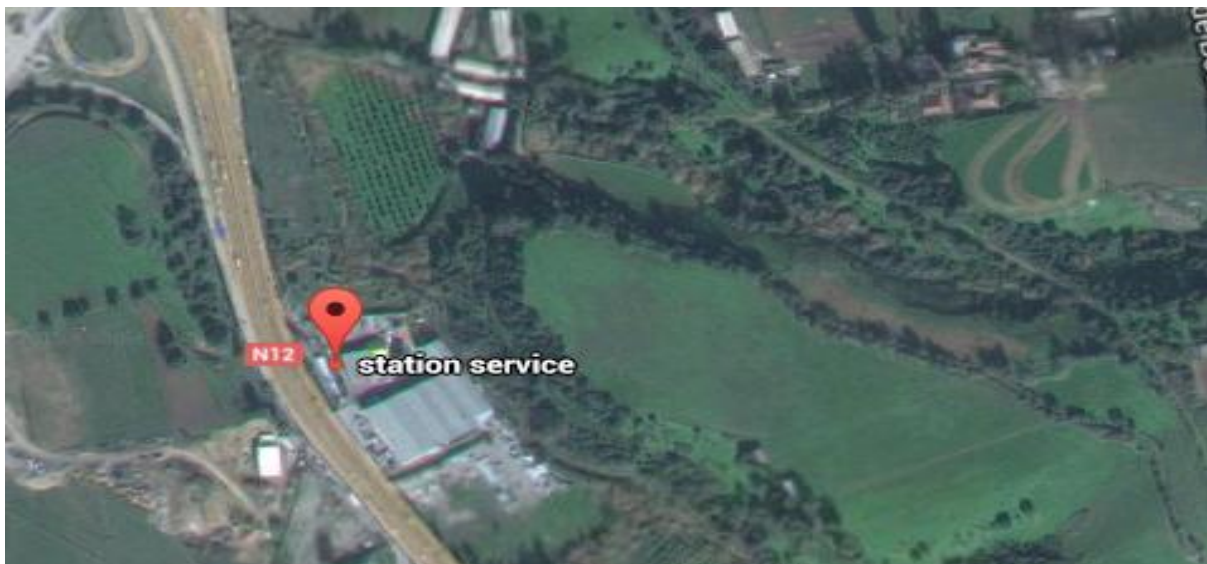


Fig. 9 : Image satellite de la station-service de Boukhalfa (Google maps, 2014)

1.2. Caractéristiques climatiques

Les données climatiques (annexe 1) de la période allant de 2003 à 2014 ont été obtenues à la station météorologique de Tizi-Ouzou.

Sur le climagramme d’Emberger (fig. 10), la station est située dans l’étage subhumide à variante tempérée.

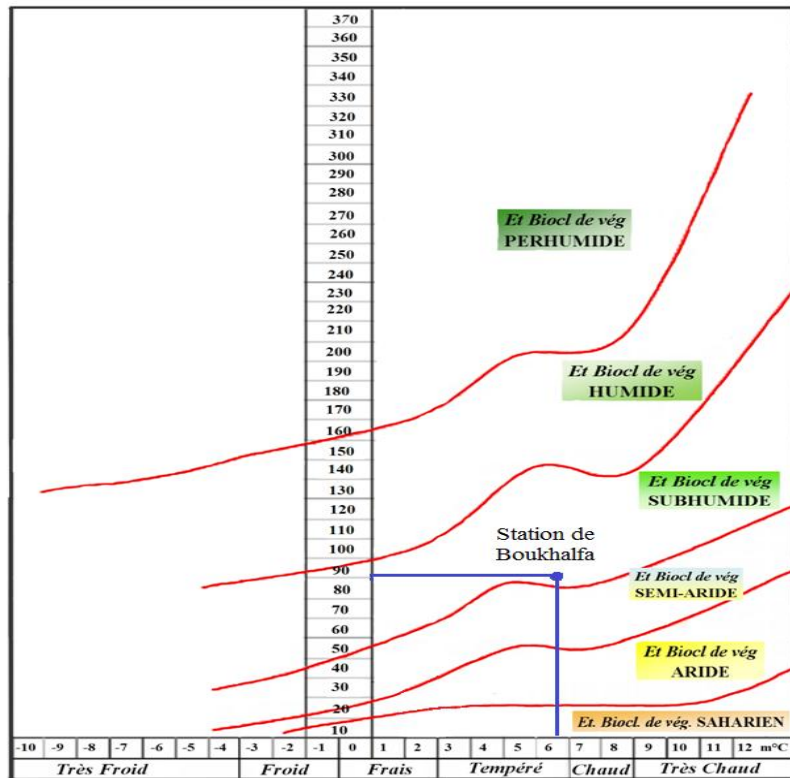


Fig. 10 : position de la station d’étude sur le climagramme d’Emberger.

Le diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausсен pour la période 2003-2014 montre que cette région présente une période sèche qui s’étale du début du mois de juin à la mi-septembre et une saison humide qui va de la fin du mois de septembre à la fin du mois de mai (fig. 11).

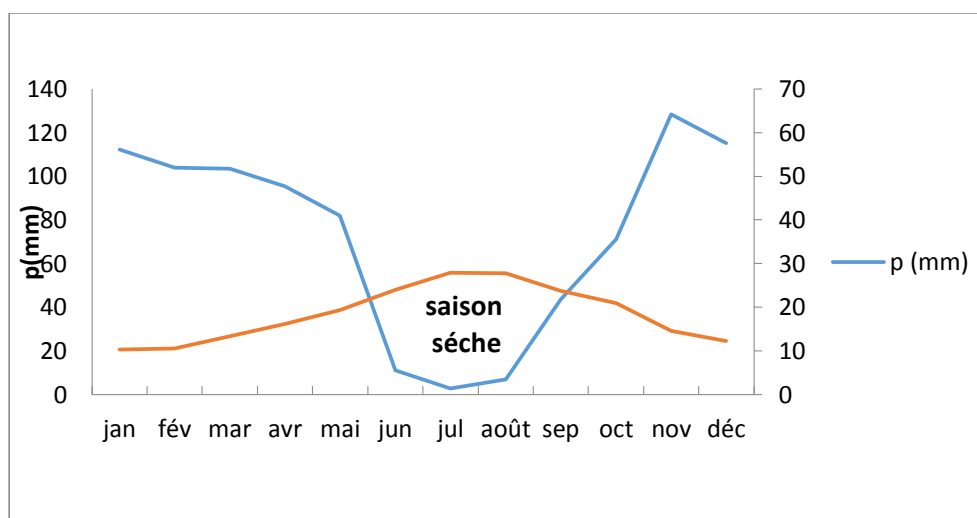


Fig. 11 : Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gausсен de la station de Boukhalfa (2003-2014).

1.3. Conditions climatiques pendant la période de l'essai

1.3.1. Températures

Les températures moyennes mensuelles, maximales et minimales de la commune de Tizi Ouzou pendant la période expérimentale sur le site effectuée durant les années 2014-2015 et 2015-2016 sont représentées dans la figure 12.

Les essais de terrain se sont déroulés entre janvier et mars 2015, et entre février à mars 2016. Les températures moyennes des mois de janvier, février, mars et avril étaient respectivement de 9 ; 9,8 ; 13,1 et 17,3°C en 2015. En 2016, les températures moyennes respectives des mois de janvier, février et mars étaient de 12,8 ; 12,6 et 12,5°C.

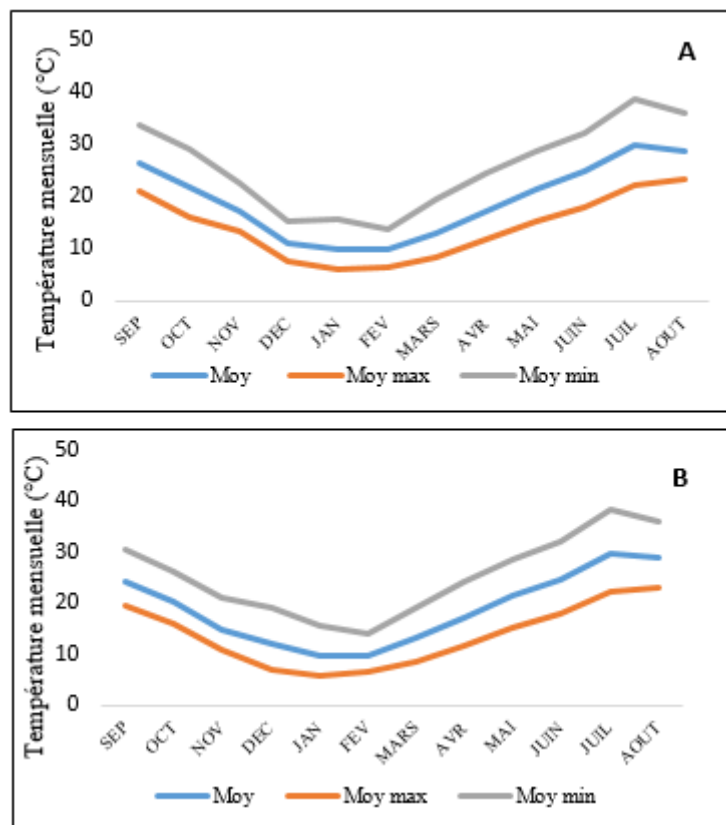


Fig. 12. Températures moyennes, maximales et minimales mensuelles de la station de Boukhalfa pendant les saisons agricoles 2014-2015 (A) et 2015-2016 (B)

1.3.2. Précipitations

Les précipitations sont un facteur très important pour la détermination d'un climat. L'eau constitue l'élément vital pour tous les organismes vivants dont la survie n'est possible qu'en présence de cet

élément. La figure 13 représente les précipitations sur le site d'étude pendant les deux années pendant lesquelles ont été menés les essais sur terrain.

Les précipitations moyennes des mois de janvier, février, mars et avril 2015 étaient de 200,9 ; 181,5 ; 70,2 et 5,4 mm respectivement. Celles enregistrées en février et mars 2016 étaient de 59,9 ; 96,2 et 185,3 mm

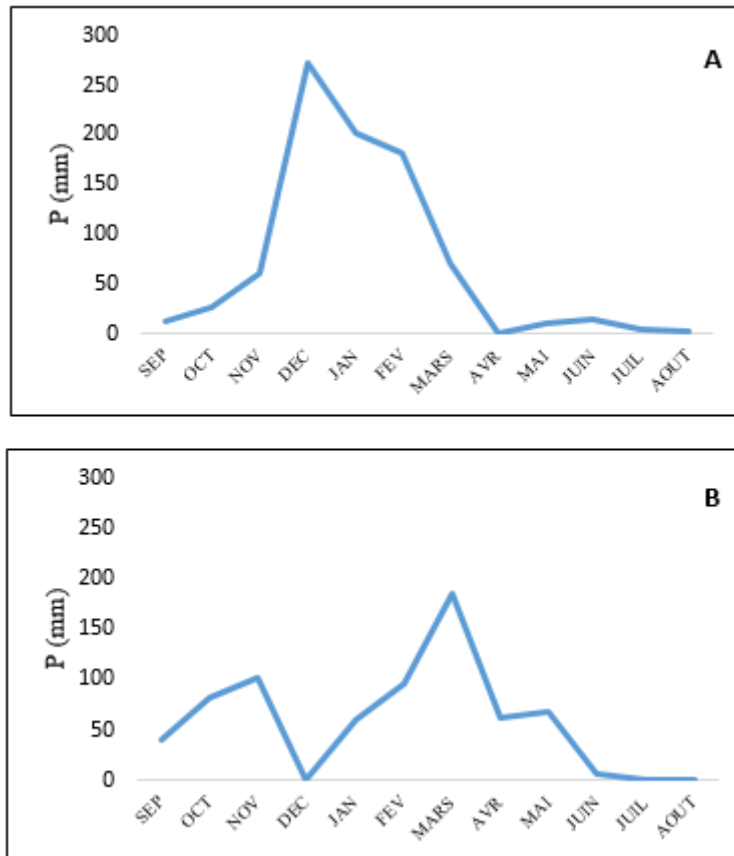


Fig. 13. Précipitations moyennes mensuelles de la station de Boukhalfa pendant les saisons agricoles 2014-2015 (A) et 2015-2016 (B)

2. Caractérisation des sols

Les hydrocarbures font partie des polluants fréquemment rencontrés dans les sols et ils peuvent altérer leurs propriétés. Il conviendrait alors d'appliquer des techniques de décontamination. Pour ce faire, il est important de comprendre les modifications physiques, chimiques et biologiques qui surviennent dans les sols. Parallèlement, il serait pertinent d'identifier les options de traitement écologiquement durables adaptées aux sites contaminés.

2.1. Matériel

2.1.1. Sol contaminé

L'étude expérimentale a été réalisée sur la couche de surface (0-20 cm) de sols prélevés sur un site pollué dans la station-service de Boukhalfa. C'est un sol contaminé par l'essence et le gasoil se déversant à partir des événements des réservoirs. Autour de la source de pollution, le sol est nu et de couleur noire, ce qui indique une forte contamination par ces rejets déversés directement sur le sol. En outre, le sol présente une pente douce qui peut jouer un rôle dans la dispersion des carburants. Il est à signaler que le sol a été dilué par ajout en surface d'un sol non pollué, ce qui peut modifier la texture de ce sol ainsi que les autres caractéristiques.

2.1.2. Sol non contaminé

Afin de pouvoir déceler les effets de la pollution, un sol non contaminé est prélevé sur la couche superficielle (0-20 cm) dans la même station à environ 10 m de la source de pollution.

2.1.3. Matériel biologique

Une espèce végétale, le maïs, a été utilisée pour évaluer l'effet de la pollution sur le sol par bio-essais. Cette espèce appartient à la famille des Poacées. Elle est connue pour sa sensibilité à la pollution par les hydrocarbures. Le taux de germination des graines et l'élongation racinaire sont les points finaux mesurés.

2.2. Méthodes

2.2.1. Prélèvement des sols

Afin de déceler un éventuel gradient de pollution par les carburants, un échantillonnage systématique a été réalisé (fig. 14). La placette nue fortement polluée a été divisée en 12 mailles de 60 x 40cm². Au centre de chacune d'entre elles, un prélèvement de sol a été effectué à l'intérieur d'un quadrat de 15cm de côté. Les mailles du haut à droite sont notées S et à gauche S', celles du bas à droite sont notées T et à gauche T'.

Pour chaque prélèvement, une quantité d'environ 200g a été conditionnée à part dans un sac en plastique. Ce sol va servir à l'étude quantitative et qualitative des carburants.

Le sol restant de tous les prélèvements a été mélangé afin de constituer un échantillon composite qui va être utilisé pour la caractérisation, les bio-essais et les essais de l'optimisation.

Dans une autre placette distante d'environ 10 m de la source de pollution, le sol a été prélevé suivant deux diagonales à raison de trois prélèvements sur chacune d'entre elles, soit au total cinq

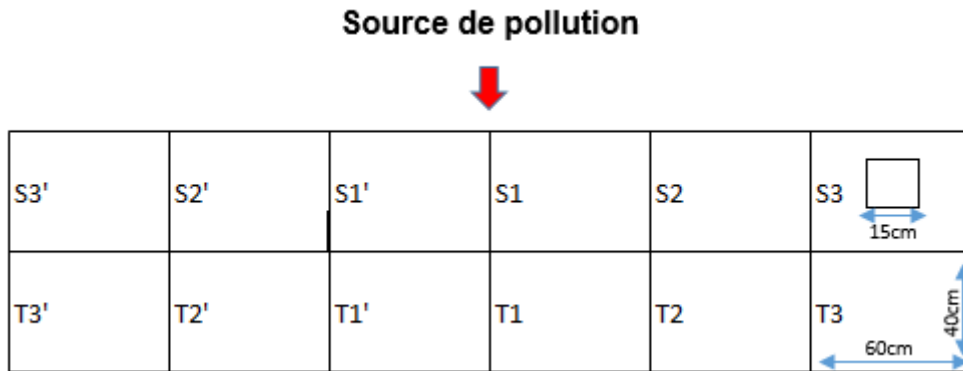


Fig. 14. Schéma de la méthode d'échantillonnage adoptée

prélèvements. Ce sol servira de témoin dans l'étude comparative qui vise à mettre en évidence l'effet des carburants sur le sol et la végétation.

L'échantillonnage du sol a été fait par temps clair, ensoleillé plusieurs jours après la pluie afin qu'il puisse se ressuyer. Les échantillons ont ensuite été acheminés au laboratoire.

2.2.2. Analyses des sols

Les analyses qui concernent la granulométrie, les éléments nutritifs, le calcaire total et le carbone organique ont été effectuées au laboratoire de pédologie de l'Institut National de la Recherche Forestière de Bainem.

Le pH, la conductivité électrique, l'humidité hygroscopique, la densité et la perméabilité ont été mesurés dans les laboratoires de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO.

Le sol est séché au préalable à l'air libre puis tamisé à 2mm. Chaque mesure a fait l'objet de trois répétitions.

2.2.2.1. Caractérisation de la pollution du site

a. Caractérisation quantitative

Afin de quantifier les carburants dans le sol, une extraction est réalisée dans l'hexane, suivie d'une centrifugation. Après évaporation du solvant, les hydrocarbures ont été pesés. Cette analyse est effectuée sur tous les prélèvements.

b. Caractérisation qualitative par FTIR

La FTIR est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle

permet via la détection des vibrations caractéristiques d'identifier les fonctions chimiques présentes. On accède ainsi directement à la structure moléculaire des matériaux analysés. Les différents montages disponibles permettent d'analyser pratiquement tout type de matériaux.

Un échantillon de sol séché est réduit en poudre pour être utilisé sous forme de traces mélangées avec le KBr, puis placé dans un manomètre pour la compression de la poudre. Les pastilles obtenues seront analysées par la FTIR.

2.2.2.2. Analyses physiques et chimiques

Les analyses du sol ont été réalisées avec les méthodes couramment utilisées en pédologie (Mathieu et Pieltain, 1998 ; Mathieu et Pieltain, 2003)

a. Granulométrie

Elle a été déterminée par la méthode internationale à la pipette de Robinson.

b. Potentiel d'hydrogène (pH)

Il a été mesuré avec la méthode potentiométrique au pH-mètre avec un rapport sol/eau égal à 1/2,5.

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre de référence HI 2210.

c. Conductivité électrique (CE)

Pour mesurer la CE, le sol a été mélangé avec l'eau distillée au rapport masse/volume de 1/5. Après une agitation, le mélange est laissé décanter. La suspension a été filtrée afin d'obtenir une solution claire et la lecture a été faite à l'aide d'un conductimètre de référence LF 42.

d. Carbone organique

Le carbone organique est dosé par la méthode Anne. Elle se fait par oxydation à chaud en milieu acide de la matière organique du sol

e. Éléments nutritifs

L'azote du sol est exprimé en pourcentage et a été dosé par la méthode Kjeldahl. Le phosphore, exprimé en P_2O_5 , est dosé par la méthode Joret-Hébert.

f. Calcaire total

Le calcaire total a été dosé par méthode volumétrique au calcimètre de Bernard

g. Humidité hygroscopique

Cette humidité est déterminée par la méthode volumétrique qui consiste à sécher dans un four à 105°C

un échantillon de sol et connaître ensuite par pesée finale le poids d'eau contenu par l'échantillon.

h. Perméabilité

La perméabilité du sol a été déterminée par la mesure de l'écoulement de l'eau à charge constante à travers une colonne de terre dans des tubes de percolation.

i. Densité apparente

Elle a été déterminée par la méthode au cylindre qui a pour principe la détermination du poids spécifique apparent d'un volume de sol prélevé.

2.2.2.3. Indicateurs de la qualité biologique du sol

Des bio-essais ont été effectués afin d'évaluer certains indicateurs de la qualité biologique du sol. Les points finaux choisis sont la biomasse microbienne, l'activité biologique globale, le rapport C/N, l'activité enzymatique et des indicateurs de phytotoxicité (germination des graines et élongation des racines).

a. Activité biologique globale

Elle est mesurée par un test respirométrique qui quantifie le CO₂ dégagé lors de l'incubation du sol selon le protocole proposé par Dommergues (1973). 50g de chaque sol sont mis dans des flacons de 250ml, dans lesquels sont placés deux tubes à hémolyse ; l'un contient de l'eau distillée (pour éviter le dessèchement du sol) et l'autre contient 5ml de NaOH 0,5N pour capter le CO₂ libéré par la respiration des microorganismes du sol (fig. 15). L'excès de NaOH est titré avec une solution d'acide sulfurique 0,25N en présence de phénolphtaléine.

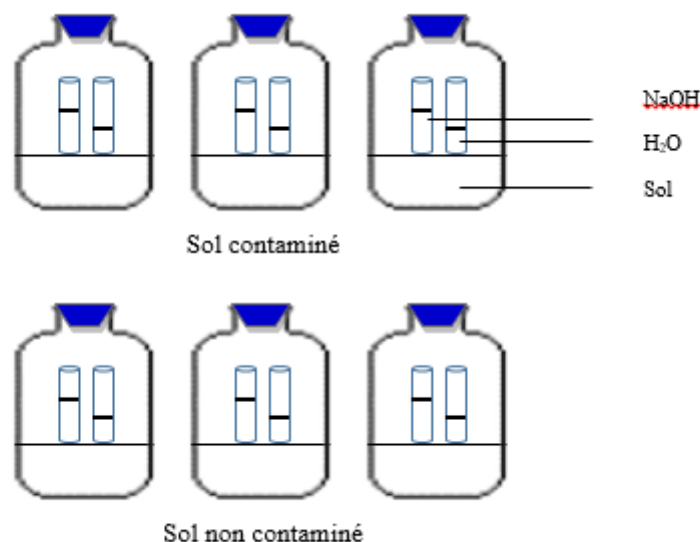


Fig. 15. Dispositif du test respirométrique

b. Biomasse microbienne

La biomasse microbienne est déterminée par fumigation-extraction selon la méthode de Jenkinson et Powelson (1976) modifiée par Nicolardot et al. (1982). Un poids de sol a été placé dans un verre de montre et exposé aux vapeurs de chloroforme pendant une nuit à 20°C. Le même poids du même sol est placé dans un autre verre de montre dans les mêmes conditions mais sans exposition au chloroforme. Le carbone extractible est extrait dans du sulfate de potassium à 0,05N (rapport sol/solution de 1/5), Après agitation et centrifugation, le surnageant est séché à 105°C pendant 24h. Le carbone est ensuite dosé dans les échantillons fumigés et non fumigés par la méthode Anne.

La biomasse microbienne est alors calculée par la formule suivante :

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

BM : biomasse microbienne.

CF : Carbone du filtrat K₂SO₄ du sol fumigé.

CNF : Carbone dans le filtrat K₂SO₄ du sol non fumigé.

K_{ec} : Coefficient d'efficacité d'extraction du carbone de la biomasse microbienne.

c. Rapport C/N

Il est calculé en divisant le taux de carbone organique par le taux d'azote total. Il renseigne sur la minéralisation du carbone dans un sol.

d. Taux de germination des graines

Le test de germination permet d'établir des pourcentages de germination dans le sol témoin et dans le sol contaminé.

Il est réalisé pour évaluer la toxicité des hydrocarbures dans le sol à l'aide de semences de maïs. Pour ce faire, 40 graines ont été placées dans des boîtes de Pétri contenant 100 g de chaque sol après addition d'eau pour atteindre 85% de la capacité de rétention. Les graines ont ensuite été recouvertes de 90 g de sable propre et incubées à 20°C pendant 15 jours (Winqvist et al., 2014). A la fin de l'essai, les graines germées ont été dénombrées. Le taux de germination (TG) est alors calculé comme suit :

$$TG (\%) = (\text{nombre de graines germées} / \text{nombre total de graines}) \times 100$$

e. Elongation racinaire

La longueur des racines des plantules de maïs a été mesurée deux fois à 15 jours d'intervalle.

La différence des deux mesures représente l'élongation racinaire. Cette mesure renseigne sur la croissance des racines en deux semaines.

2.2.2.4. Caractérisation du sol pendant la période expérimentale

La caractérisation du sol pollué a été réalisée sur trois années. La caractérisation quantitative de la pollution, la caractérisation physique et chimique ainsi que les indicateurs de la qualité biologique du sol ont été mesurées sur un échantillon composite.

2.2.3. Analyse statistique

Une comparaison de deux moyennes a été effectuée avec le logiciel R pour les paramètres mesurés. La pollution du sol représente la variable de classement pour comparer le sol pollué au sol non pollué. Le test de Student est réalisé lorsque les données suivent une loi normale et le test de Mahn-Witney est effectué dans le cas contraire.

3. Sélection d'espèces végétales tolérantes aux carburants

Afin de décontaminer le sol pollué du site d'étude, la phytoremédiation est l'une des techniques envisagées. Mais pour que celle-ci soit efficace, il faut utiliser une espèce qui tolère la pollution par les carburants. C'est pourquoi, plusieurs espèces végétales ont fait l'objet de bio-essais afin de déterminer l'espèce la moins affectée par la pollution

3.1. Matériel

3.1.1. Sol

Les sols ayant servi de matériel dans cette expérience, à savoir un sol pollué aux carburants provenant du site d'étude et un sol non pollué par les carburants provenant de la même station distant de la source de pollution, sont les sols caractérisés dans la section précédente.

3.1.2. Matériel végétal

Des bio-essais ont été réalisés sur différentes espèces végétales afin de déceler les plus tolérantes d'entre elles à la pollution aux carburants. Ces espèces appartiennent aux familles des Poacées et des Fabacées car elles sont souvent citées comme exemples de plantes tolérantes à la pollution par les hydrocarbures.

Huit espèces ont été utilisées dans cette expérience, à savoir l'orge (*Hordeum vulgare*), le blé (*Triticum durum*), le sorgho (*Sorghum bicolor*) et l'avoine (*Avena sativa*) de la famille des Poacées (Monocotylédones), la fève (*Vicia faba*), le pois (*Pisum sativum*), la luzerne (*Medicago sativa*) et

le trèfle (*Trifolium alexandrinum*) de la famille des Fabacées (Dicotylédones). Les graines ont été fournies par l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures).

3.2. Méthodes

Un essai de laboratoire a été réalisé afin de dégager les espèces tolérantes vis-à-vis de la pollution aux carburants. Ces espèces sont ensuite cultivées sur le site pour évaluer leur tolérance dans les conditions naturelles.

3.2.1. Mise en culture au laboratoire

Les sols frais sont tamisés à 5 mm puis repartis sur des pots de 15 cm de diamètre et 15 cm de profondeur à raison de 1Kg par pot. Des galets sont placés au fond des pots et sont surmontés d'une couche de sable afin d'assurer un bon drainage du sol. Pour chaque espèce végétale, trois répétitions ont été effectuées pour chacun des sols (fig.16). Les graines sont semées en respectant la dose de semis de chaque espèce selon le catalogue "Semences de France" qui a été ramenée à la surface du pot. Le nombre de graines semées a été de 3 pour la fève et le pois, de 5 pour la luzerne et le trèfle et de 4 graines pour les autres espèces.

Un arrosage et un désherbage manuel ont été effectués régulièrement. La culture a été conduite pendant trois mois. Les paramètres végétatifs déterminés sont le taux de levée, la hauteur de la tige et la biomasse végétale. Le taux d'inhibition de chacun des paramètres a été calculé selon la formule proposée par Nithyameenakshi et al. (2006).

3.2.1.1. Taux de levée

La levée représente le stade pendant lequel les plants lèvent au-dessus du sol. C'est le premier paramètre végétatif qui rend compte de la germination des graines. Il est déterminé trois semaines après le semis en calculant un pourcentage de plants levés par rapport au nombre de graines semées par pot.

Le taux d'inhibition (TI) est calculé par la formule suivante :

$$TI = [(TG_{SC} / TG_{SNC}) * 100] - 100$$

TG_{SC} : taux de germination dans le sol contaminé

TG_{SNC} : taux de germination dans le sol non contaminé

3.2.1.2. Hauteur de la tige

La croissance est déterminée par la mesure hebdomadaire (en cm) de la hauteur de la tige, du collet jusqu'au bourgeon terminal.

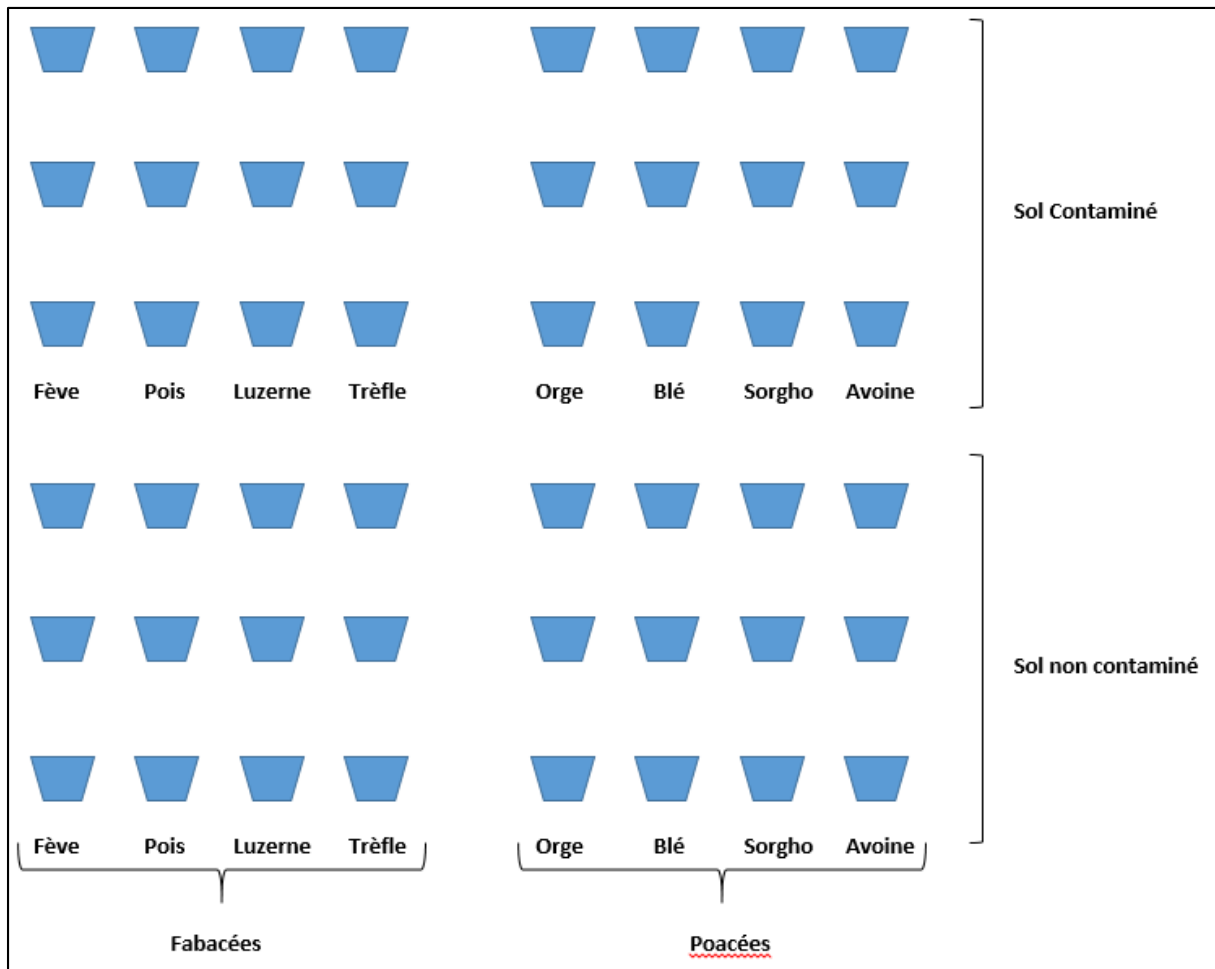


Fig. 16. Dispositif de la culture en pot des espèces végétales

Le taux d'inhibition de la croissance en hauteur de la tige est calculé comme suit :

$$TI = [(HT_{SC} / HT_{SNC}) \times 100] - 100$$

HT_{SC} : hauteur de la tige dans le sol contaminé

HT_{SNC} : hauteur de la tige dans le sol non contaminé

3.2.1.3. Biomasse végétale

Après trois mois, les plants ont été récoltés, avant la formation des fleurs, puis lavés. La partie aérienne a été séparée de la partie racinaire. Après séchage, les parties aériennes et racinaires ont été pesées. Le taux d'inhibition (TI) pour la croissance aérienne et racinaire est calculé par les formules suivantes :

$$TI = [(BA_{SC} / BA_{SNC}) \times 100] - 100$$

BA_{SC} : Biomasse aérienne dans le sol contaminé

BA_{SNC} : Biomasse aérienne dans le sol non contaminé

$$TI = [(BR_{SC} / BR_{SNC}) \times 100] - 100$$

BR_{SC} : Biomasse racinaire dans le sol contaminé

BR_{SNC} : Biomasse racinaire dans le sol non contaminé

3.2.1.4. Nombre de nodules/plant

Après la récolte des plants, les nodules symbiotiques ont été dénombrés sur chaque plant. Le taux d'inhibition de la formation des nodules est donné par la formule suivante :

$$TI = [(NNd / NNd_{SNC}) \times 100] - 100$$

NNd_{SC} : Nombre de nodules formés par plant dans le sol contaminé

NNd_{SNC} : Nombre de nodules formés par plant dans le sol non contaminé

3.2.2. Mise en culture in situ

Sur le site pollué, une parcelle de 5m² à proximité de la source de pollution a été divisée en placettes de 40 cm x 50 cm. Dans chaque placette, les graines ont été semées en respectant les doses de semis des espèces. Une bande de 10 cm est laissée entre les placettes (fig. 17). Les deux espèces retenues pour l'essai de terrain et qui auront donné des résultats satisfaisants en laboratoire sont notées Sp1 et Sp2.

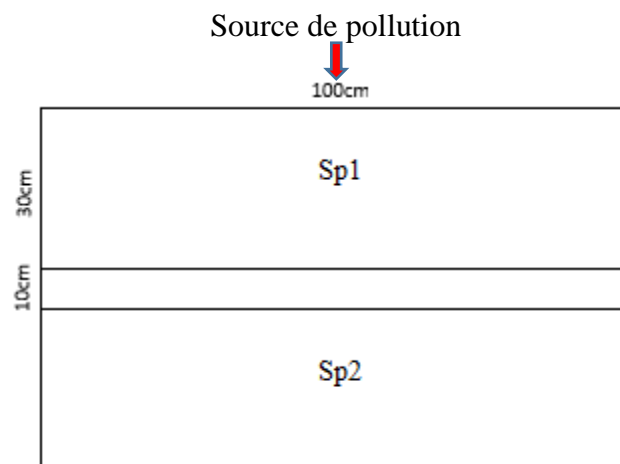


Fig. 17. Dispositif de la culture des espèces tolérantes sur le site

Les paramètres végétatifs mesurés sur le terrain sont le taux de levée, la hauteur de la tige et la biomasse végétale.

3.2.3. Analyse statistique

Les résultats des paramètres de végétation sont soumis à un test de comparaison de plusieurs

moyennes en utilisant le logiciel R. Le test utilisé est l'anova à un facteur de classification lorsque les conditions de normalité et d'égalité des variances sont vérifiées. Sinon, on applique le test de Kruskal-Wallis. Dans le cas où les différences entre les espèces végétales, sont significatives, des groupes homogènes sont déterminés par le test de Newman-Keuls ou par le test post-hoc de Kruskal-Wallis se trouvant dans la librairie "agricolae" du logiciel R.

4. Production de tensioactifs biologiques

L'aptitude des souches bactériennes à produire des tensioactifs leur offre un avantage certain dans la dégradation des hydrocarbures. Ces souches ont été testées par rapport à leur aptitude à produire ces substances émulsifiantes des hydrocarbures.

4.1. Matériel

Dans cette partie, l'aptitude à produire des tensioactifs a été étudiée sur cinq souches bactériennes connues pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures. Il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa*, et *Bacillus cereus* fournies par le CHU Nedir Mohammed de Tizi Ouzou et *Pseudomonas putida*, *Corynebacterium fascians* et *Micrococcus sp.*, isolées à partir d'un sol pollué aux hydrocarbures, identifiées et conservées au laboratoire.

4.2. Méthodes

4.2.1. Culture des souches bactériennes

Les suspensions bactériennes ont été ensemencées sur milieu solide. Une pré-culture suivie de la culture ont été réalisées sur milieu liquide selon le protocole cité par Persson et Molin (1987) et Abu Ruwaida et al. (1991).

4.2.1.1. Ensemencement

Les souches ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu solide composé de 3g d'extrait de levure, 5g de K_2HPO_4 , 2g de $MgSO_4$, 2g de KH_2PO_4 , de 0.01 de NaCl et 20g de gélose. Ces éléments ont été dissous dans 1L d'eau distillée. Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20mn puis réparti sur les boîtes de Pétri et laissé solidifier devant un bec-bunsen. Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

4.2.1.2. Pré-culture

Après incubation, les souches ont été inoculées dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant un milieu liquide dont la composition, par litre d'eau distillée, est de 2,2g de K_2HPO_4 , 0,6g de

MgSO₄, 0,05g de NaCl, 1,4g de KH₂PO₄, 3g de (NH₄)₂SO₄, 0,02g de CaCl₂ et 0,01g de (FeSO₄, 7H₂O). A ce milieu est ajouté 1ml d'une solution d'oligo-éléments contenant, par litre d'eau distillée 525mg de (ZnSO₄, 7 H₂O), 0,6g de MgSO₄, 705mg de CuSO₄, 200mg de (CaCl₂, 6 H₂O), 15mg de H₃BO₃, 0,01g de (NiSO₄, 6 H₂O) et 1,5g de glucose. Après stérilisation, 1ml de kérosène est ajouté à ce milieu de culture. Des Erlenmeyers sont alors placés sur des plaques chauffantes à 28°C avec agitation.

4.2.1.3. Culture

Pour obtenir une quantité suffisante de tensioactifs, 10 ml de la pré-culture sont ajoutés à 2L de milieu liquide de même composition dans des Erlenmeyers de 5L qui sont ensuite placés sur des plaques chauffantes dans les mêmes conditions pendant 7 jours.

4.2.1.4. Isolement et purification des tensioactifs

Cette étape consiste à séparer les tensioactifs des cultures bactériennes puis à les extraire dans du n-heptane en créant des émulsions comme décrit dans la figure 18.

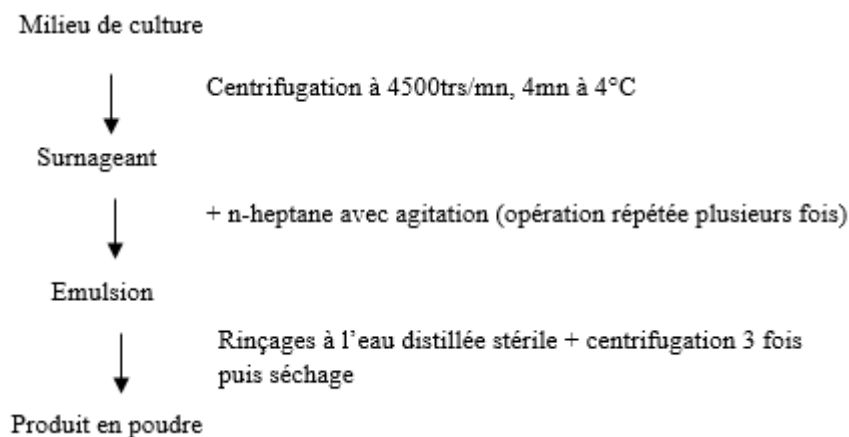


Fig. 18. Etapes de l'isolement et de la purification des tensioactifs (Persson et Molin, 1987 modifié)

4.2.1.5. Evaluation de la production des tensioactifs

a. Tension de surface

La tension superficielle du milieu de culture stérile ainsi que celle des moûts de fermentation sont mesurées avec un tensiomètre Kruss K10T. On considère qu'il y a présence de tensioactifs dans le milieu si la tension de surface est abaissée de moitié par rapport au milieu stérile.

b. Indice d'émulsification (E₂₄)

Il est déterminé selon la méthode de Cooper et Goldenberg (1987) décrite par Banat (1995). Le test consiste à mélanger 4 ml du moût de fermentation avec 6 ml de kérosène dans des tubes à essai et les agiter énergiquement afin de former une émulsion.

Après décantation pendant 24h, la hauteur de l'émulsion est mesurée et l'indice E₂₄ est calculé par la formule suivante :

$$E_{24} = (h_e / h_t) \times 100$$

h_e : hauteur de l'émulsion stable après 24h

h_t : hauteur totale du mélange

c. Rendement de la production de tensioactifs

Le rendement de production de tensioactifs est calculé par le rapport entre la quantité de tensioactifs produits et la biomasse. Il est exprimé en pourcentage.

4.2.2. Analyse statistique

Une comparaison de plusieurs moyennes a été effectuée avec le logiciel R pour les paramètres mesurés. Dans le cas où les différences sont observées entre les souches bactériennes, des groupes homogènes sont déterminés par un test post-hoc. Lorsque les données sont gaussiennes et les variances égales, l'anova est réalisée pour comparer les moyenne obtenues pour les différentes souches, suivi du test de Newman-Keuls pour établir les groupes homogènes. Dans le cas où l'une des deux conditions n'est pas satisfaite, c'est le test de Kruskal-Wallis qui est réalisé suivi de son post-hoc se trouvant dans le package "agricolae" du logiciel R.

5. Optimisation mathématique des techniques biologiques de décontamination

L'optimisation mathématique vise à résoudre le problème de l'efficacité d'un traitement appliqué en calculant les solutions optimales des paramètres choisis. La méthode utilisée est l'optimisation par algorithmes génétiques.

5.1. Matériel

5.1.1. Sol

Le sol utilisé dans cet essai est le sol pollué provenant de la station-service qui aura été caractérisé comme décrit dans la section 2 de ce chapitre.

5.1.2. Fertilisants

Pour la biostimulation, le sol a été enrichi en phosphore et en azote qui sont, en général, deux éléments manquants dans le sol contaminés aux hydrocarbures et sont importants pour la croissance bactérienne. Ces éléments sont des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures. Ils sont apportés sous forme de sels. Le phosphore utilisé est sous forme de phosphate dipotassique (monobasique), de formule chimique K_2HPO_4 . C'est une poudre blanche avec un poids moléculaire de 174,18g/mol.

L'azote est utilisé sous forme de sulfate d'ammonium, de formule chimique $(NH_4)_2SO_4$. Il est sous forme de cristaux, de couleur blanchâtre et d'un poids moléculaire de 132,14g/mol.

5.1.3. Matériel végétal

L'espèce végétale utilisée dans la phytoremédiation est l'espèce qui aura toléré le plus la présence des carburants dans le sol dans les essais de laboratoire et de terrain, parmi les huit espèces testées (section 3 de ce chapitre).

Une autre espèce, le maïs qui est sensible à la pollution aux hydrocarbures est utilisé dans un bio-essai permettant d'évaluer l'efficacité du traitement. Une augmentation du taux de germination traduit une baisse de la toxicité et donc la dissipation des hydrocarbures.

5.1.4. Souche bactérienne

Pour appliquer la bioaugmentation, la souche qui aura eu le meilleur rendement de production de tensioactifs parmi les souches testées (section 4 de ce chapitre) sera utilisée.

5.2. Méthodes

5.2.1. Traitement du sol pollué par biostimulation

Un traitement de biostimulation a été appliqué pour stimuler l'activité des bactéries indigènes, en ajoutant au sol contaminé différentes doses d'engrais N et P calculées sur la base d'un rapport C/N/P de 100/10/1 (Abid et al., 2014) en tenant compte du taux d'azote et de phosphore contenus initialement dans le sol. Les concentrations d'engrais testées étaient de 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1g de K_2HPO_4 , correspondant respectivement aux traitements P1, P2, P3 et P4 et 2,07 ; 4,14 ; 6,21 et 8,28g de $(NH_4)_2SO_4$ notés N1, N2, N3 et N4 respectivement. Les engrais ont été ajoutés sous forme de solutions à 200g de sol contaminé contenus dans des bouteilles en verre. Les sols ont été maintenus à température ambiante pendant 2, 4, 6 et 8 semaines correspondant respectivement à T1, T2 et T3. Chaque combinaison entre doses de fertilisants et durée du traitement a été répétée trois fois.

5.2.2. Traitement par bioaugmentation du sol pollué

Le traitement par bioaugmentation a pour objectif d'augmenter le potentiel biologique du sol en y injectant une suspension bactérienne. La souche est choisie selon les résultats de la section précédente. La souche qui aura produit un tensioactif de qualité avec le meilleur rendement de production sera multipliée puis injectée dans 200g de sol.

Pour optimiser cette technique, différentes concentrations de la suspension ont été testées. Elles sont notées D1, D2, et D3 correspondant à $1,9 \cdot 10^6$; $2,85 \cdot 10^6$ et $3,8 \cdot 10^6$ CFU/ml. La concentration $3,8 \cdot 10^6$ CFU/ml représente la densité d'une suspension de la souche utilisée, incubée à 37°C pendant 24h. Les deux autres concentrations représentent $\frac{1}{2}$ et $\frac{3}{4}$ de la solution-mère. Cette technique est également appliquée pendant 4, 6 et 8 semaines, avec 3 répétitions pour chaque combinaison.

5.2.3. Traitement par phytoremédiation du sol pollué

L'espèce à utiliser dans ces essais sera celle qui montrera la meilleure tolérance vis-à-vis des carburants dans l'expérience de laboratoire et de terrain réalisées au préalable. Afin d'optimiser la phytoremédiation, deux paramètres ont été choisis, à savoir la dose de semis étant donné que les hydrocarbures exercent un effet dépressif signalé par plusieurs auteurs sur la germination des graines (Chaineau et al., 1997 ; Siddiqui et al., 2001 ; Haider et al., 2021). La dose de semis préconisée est de 170 graines/m². Cinq doses de semis ont été utilisées : 57 ; 113 ; 170 ; 226 et 283 correspondant à DS1, DS2, DS3, DS4 et DS5. Ces doses représentent $\frac{1}{3}$, $\frac{2}{3}$, $\frac{3}{3}$, $\frac{4}{3}$ et $\frac{5}{3}$ de la dose de semis. La culture a été menée dans des pots comme décrit précédemment, pendant 4, 6 et 8 semaines avec trois répétitions pour chaque combinaison.

5.2.4. Evaluation de l'efficacité des traitements

L'efficacité des trois traitements biologiques appliqués à savoir, la biostimulation, la bioaugmentation et la phytoremédiation, est évaluée par des bio-essais réalisés sur le sol traité.

Elle a été évaluée au laboratoire en mesurant la biomasse microbienne du sol et la toxicité des carburants résiduels sur la germination des graines du maïs à la fin du traitement pour toutes les techniques. Un taux de germination supérieur au taux obtenu dans le sol pollué avant traitement indique une réduction de la toxicité. La respiration microbienne a été mesurée pendant l'incubation dans le cas de la biostimulation et de la bioaugmentation, et après récolte dans le cas de la phytoremédiation en incubant le sol traité pendant 7 jours à 28°C. Les méthodes utilisées ont été décrites dans la section 2 de ce chapitre.

5.2.5. Méthodes mathématiques

Des régressions multiples, une matrice de corrélation, une optimisation par algorithmes génétiques (GA) et une analyse graphique ont été réalisées avec le logiciel R.

Une matrice de corrélation a été calculée pour déterminer les relations linéaires entre le taux de germination des graines de maïs, le C-CO₂ libéré et la biomasse microbienne du sol.

L'optimisation mathématique des trois techniques a été effectuée en calculant dans un premier temps, une régression multiple pour établir les relations entre l'efficacité du traitement (reflétant la qualité biologique du sol) comme variable de réponse et représentée ici par le taux de germination des graines de maïs, et les variables explicatives qui sont la durée du traitement et la concentration de l'engrais, la densité de la suspension bactérienne ou la densité de semis de la fève.

Le modèle linéaire obtenu a, ensuite, été optimisé par programmation des algorithmes génétiques en utilisant le package GA du logiciel R. La fonction d'évaluation dont les variables sont les paramètres à optimiser recherche les individus donnant un bon taux de germination qui indiquerait la réduction de la pollution du sol. Les solutions recherchées sont celles qui donnent un taux de germination de plus de 70%. La taille de la population a été fixée à 50 individus pour chaque modèle. C'est cette population qui sera générée par l'algorithme génétique et qui regroupera les solutions du problème posé. Ces solutions ont été soumises à une analyse en composantes principales (ACP) et à une classification hiérarchique afin de déterminer la classe contenant les solutions optimales.

6. Applications au laboratoire et in situ des solutions optimales

Les solutions optimales obtenues dans la section précédente ont d'abord été appliquées au sol pollué dans un essai mené au laboratoire puis dans un autre essai in situ. L'objectif de cette démarche est de valider les solutions calculées par l'algorithme génétique au laboratoire et sur le site.

6.1. Matériel

Le sol utilisé est le sol du site pollué de la station-service. Les fertilisants sont les sels K₂HPO₄ et (NH₄)₂SO₄ qui constituent des sources d'azote et de phosphore. La souche utilisée est celle qui a donné les meilleurs résultats quant à la production de tensioactifs. L'espèce végétale est celle qui a montré la plus grande tolérance vis-à-vis de cette contamination. Le maïs est utilisé dans le test de germination pour évaluer la toxicité résiduelle.

6.2. Méthodes

6.2.1. Expérience de laboratoire

L'une des solutions optimales obtenues pour chacun des modèles a été appliquée dans un test en laboratoire pour valider les résultats de l'optimisation. Une des concentrations optimales obtenues pour chaque fertilisant ((NH₄)₂SO₄ et K₂HPO₄) a été appliquée. Le sol contaminé (stocké à 4°C) a été tamisé et incubé dans des flacons contenant chacun 200g de sol pour déterminer l'activité biologique, la biomasse microbienne. Le pourcentage de germination des graines de maïs a également été évalué. Ces bio-essais ont tous été effectués après la durée optimale de traitement.

6.2.2. Expérience in situ

La solution optimale appliquée pour valider le modèle dans une expérience de laboratoire est appliquée sur le terrain afin d'estimer l'efficacité de la biostimulation en conditions naturelles.

L'expérience a été réalisée dans la station-service à partir de laquelle le sol a été prélevé pour l'expérience en laboratoire. Sur une parcelle située à proximité de la source de pollution, trois échantillons de sol ont été prélevés, pesés et les quantités d'engrais correspondantes ont été calculées puis incorporées. Pour l'application de la bioaugmentation sur le site, trois échantillons ont été prélevés, pesés et inoculés avec la suspension. Les échantillons de sol ont ensuite été mis dans un sac en tissu maillé, et remis en place.

Après la durée optimale donnée par le modèle, les échantillons de sol ont été à nouveau prélevés et ont été soumis aux mêmes essais biologiques.

6.2.3. Combinaisons de techniques in situ

Sur le site, des placettes ont été délimitées de part et d'autre de la source de pollution comme représenté dans la figure 19. La solution optimale de fertilisants (Bs) ainsi que la densité optimale de la suspension bactérienne (Ba) ont été appliquées sur des placettes de 40cm x 20cm. La moitié des placettes traitées a été semée par une espèce végétale tolérante à la pollution (Ph). Des bandes de 10cm séparaient les placettes les unes des autres. Dans cette section, une placette est consacrée à l'atténuation naturelle (An) qui va servir de référence. Le sol de cette placette n'a subi aucun traitement, la baisse de la pollution peut être due à la dissipation des hydrocarbures par les processus naturels (volatilisation, dégradation,...). La répartition des traitements s'est faite aléatoirement.

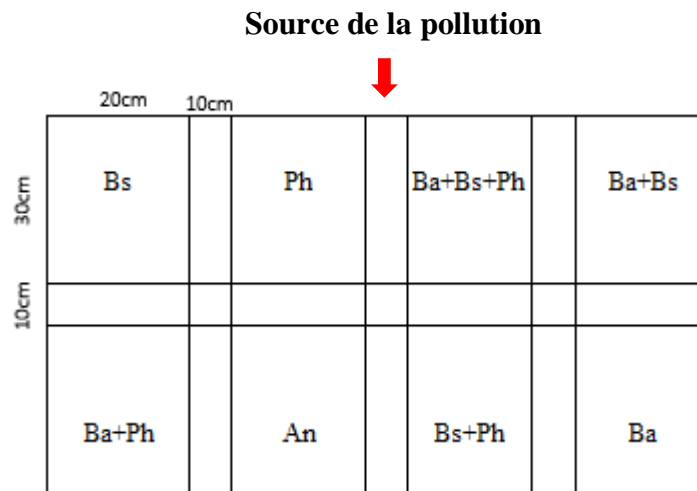


Fig. 19. Dispositif d'application des traitements combinés *in situ*

Après la durée optimale donnée par le modèle, trois échantillons de sol ont été prélevés de chaque placette pour servir de matériel au test de germination des graines de maïs.

Afin d'évaluer l'efficacité des traitements par rapport à l'atténuation naturelle, une analyse des sols par FTIR a été effectuée.

6.2.4. Analyses statistiques

Les résultats de l'essai sur site sont soumis à l'anova si la normalité et l'égalité des variances sont vérifiées. Sinon, c'est le test de Kruskal-Wallis qui est appliqué. Lorsque les différences entre les moyennes sont significatives, un test post-hoc est appliqué pour les classer dans des groupes. La comparaison est faite entre les techniques appliquées seules et en combinaison entre elles et avec l'atténuation naturelle dans l'essai de terrain.

7. Valorisation des plantes utilisées dans les essais en laboratoire

Les plantes utilisées dans l'essai de laboratoire ont probablement absorbé les hydrocarbures contenus dans le sol. Leur restitution au sol ne peut être une solution car elles peuvent libérer ces polluants lors de leur décomposition. Une solution alternative peut consister à utiliser la biomasse de ces plantes pour produire des biocarburants.

7.1. Matériel

7-1.1. Matériel végétal

Les plantes utilisées dans la culture en pots ont été récoltées et ont servi à la caractérisation, par

FTIR, des hydrocarbures dans les plantes. Elles ont servi aussi de biomasse pour la production de biocarburants de deuxième génération par la voie biochimique.

7.1.2. Levure

La levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) a été utilisée dans la production des biocarburants car elle est connue pour son efficacité dans la fermentation des sucres conduisant à la production d'éthanol.

7.2. Méthodes

7.2.1. Analyse des hydrocarbures dans les plantes

Elle a été réalisée par FTIR sur des échantillons de plantes selon le protocole décrit dans la section 1 de ce chapitre.

7.2.1. Production de bioéthanol

La voie biochimique a été suivie pour produire du bioéthanol à partir de la biomasse ligno-cellulosique obtenue après culture sur un sol contaminé aux carburants. Ce processus de production comprend quatre étapes : le prétraitement, l'hydrolyse acide, la fermentation et la distillation, comme décrit par Grammont (2006) et Ballerini (2006).

7.2.1.1. Prétraitement

Après broyage des plantes au mortier, de l'acide sulfurique 0,3% a été ajouté à la biomasse ligno-cellulosique et chauffé pendant 20 mn à 150°C. Cette pré-hydrolyse avec un acide dilué vise à déstructurer le matériau ligno-cellulosique, et peut être la première étape de l'hydrolyse acide.

7.2.1.2. Hydrolyse acide

Elle s'effectue également par l'ajout d'un acide dilué, à une concentration de 0,5% chauffé à 200°C pendant 5 mn. Au cours de cette étape, les ligno-celluloses et la cellulose sont successivement hydrolysées en sucres.

7.2.1.3. Fermentation

La fermentation du glucose en éthanol est une réaction exploitée depuis des siècles. Il est fabriqué grâce à la levure de boulanger traditionnelle *S. cerevisiae*. La fermentation a été réalisée pendant 72h.

7.2.1.4. Distillation

Un ballon à fond rond de 1L contenant le moût de fermentation a été relié à une colonne qui le reliait à la tête de distillation. Après chauffage pendant 15mn, l'alcool produit a été récupéré.

7.2.2. Evaluation de la production de l'éthanol

Afin de vérifier si de l'éthanol a été produit, un éthylotest est réalisé à l'aide de bichromate de potassium. La couleur passe de l'orange au vert si le milieu contient de l'alcool.

Chapitre III : Résultats et discussion

Avant d'entreprendre une quelconque opération de décontamination, il est impératif de caractériser le sol pollué, ce qui va orienter le choix de la technique à appliquer.

1. Caractérisation du sol

Dans cette section, un sol pollué par les carburants, provenant d'une station-service, et un sol non pollué ont été analysés pour mettre en évidence l'effet de ces substances, après avoir caractérisé la pollution.

1.1. Caractérisation de la pollution du sol

La quantification de la pollution effectuée sur les échantillons de sol contaminé (fig. 20) montre l'existence sur le site d'un gradient de pollution entre les prélèvements 1, 2 et 3. La quantité de carburants diminue en s'éloignant de la source d'émission. Mais les différences observées entre les échantillons S, S', T et T' ne sont pas significatives, ce qui témoigne d'une répartition homogène de la pollution.

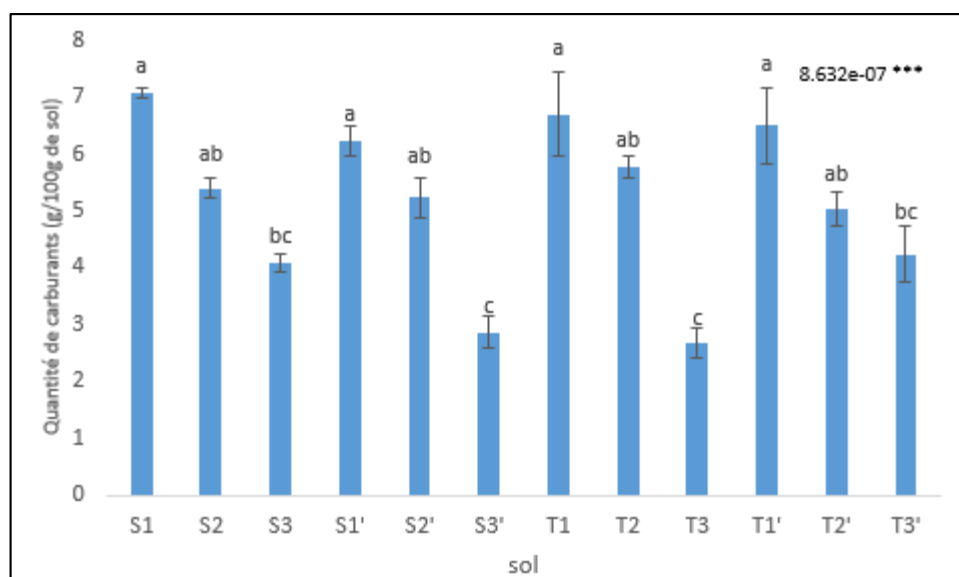


Fig. 20. Quantité d'hydrocarbures dans les prélèvements de sol contaminé

La quantité moyenne d'hydrocarbures dans le sol témoin est de 0,018mg/100g de sol. Cette quantité est faible (< 0,01mg/g de sol), ce qui confirme que ce sol n'est pas pollué.

L'analyse des sols par FTIR a montré qu'il y avait des différences de composition entre le sol contaminé et le témoin (fig. 21). Le spectre IR du sol contaminé fait apparaître tous les groupes d'hydrocarbures présents dans l'essence et le gasoil. On observe des pics correspondant aux alcanes à 1428,34 et 2925,1cm⁻¹, aux alcènes à 11635,98cm⁻¹ et aux aromatiques à 792,46 cm⁻¹

Le même constat est fait pour le spectre IR du sol non contaminé, sauf que dans ce cas l'intensité des pics montre que la quantité des hydrocarbures est beaucoup plus faible.

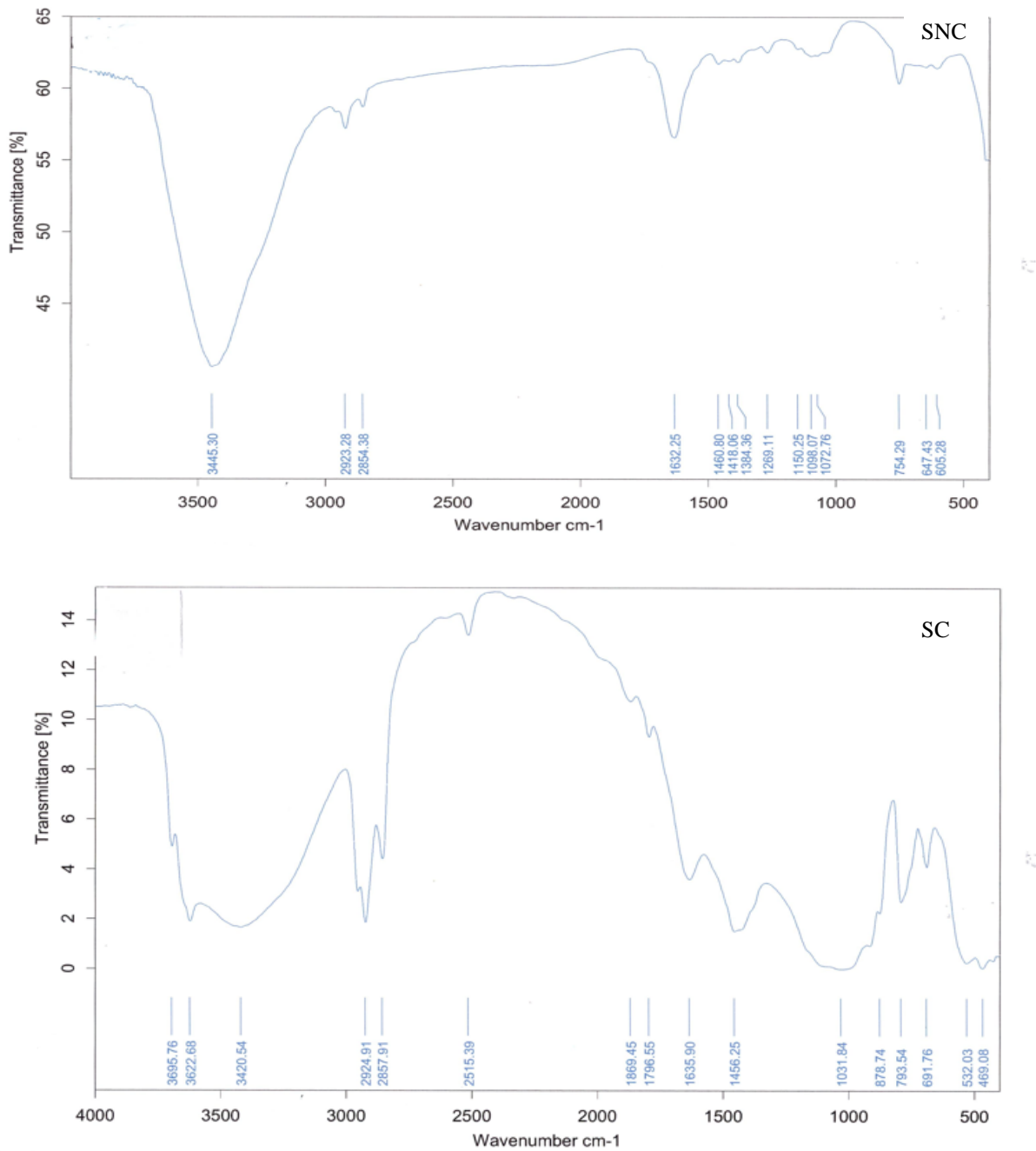


Fig. 21. Comparaison des spectres IR du sol contaminé (SC) et du sol témoin (SNC).

1.2. Propriétés physiques et chimiques

Le sol contaminé est caractérisé par une couleur plus foncée par rapport au sol témoin, par l'odeur caractéristique des hydrocarbures et par un aspect plus compact.

L'analyse granulométrique (tableau 11) a fait ressortir une similitude entre les deux sols (contaminé et non contaminé) du point de vue des proportions des fractions granulométriques.

Tableau 11. Résultats de l'analyse granulométrique des sols

Sol Fraction	SC	SNC
Argile (%)	21,4	22,1
Limon (%)	42,1	40,3
Sable (%)	36,5	39,6

La projection des différentes fractions sur le triangle textural montre qu'il s'agit, pour les deux sols, d'une texture "limons sablo-argileux". Il est à noter qu'une dilution de la pollution est pratiquée sur le site pollué en mélangeant le sol pollué de surface à un sol ne provenant pas de la station.

La figure 22 représente une comparaison entre les propriétés physiques et chimiques des sols contaminé et non contaminé. La pollution aux carburants n'influe pas sur la teneur du sol en azote, en phosphore et en calcaire total, et n'influence pas la conductivité électrique. En revanche, le taux de carbone organique, la densité apparente et l'humidité sont très significativement plus élevés dans le sol contaminé. Le pH et la perméabilité du sol par contre étaient plus élevés dans le sol non contaminé.

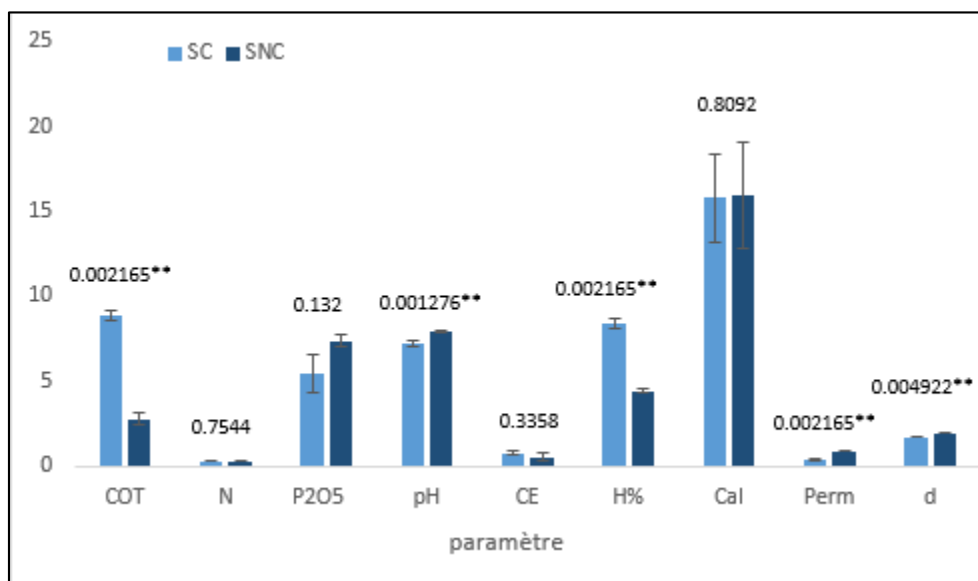


Fig. 22. Effet de la contamination sur les propriétés physiques et chimiques du sol

Le sol contaminé présente des teneurs élevées en carbone organique et en azote, une teneur très faible en phosphore assimilable et modérée en calcaire total. C'est un sol non salé à pH neutre et à perméabilité très lente.

Le sol non contaminé quant à lui, présente une teneur moyenne en matière organique, élevée en azote, très faible en phosphore assimilable et modérée en calcaire. Ce sol n'est pas salé, à pH légèrement alcalin et à perméabilité lente.

1.3. Qualité biologique du sol

La contamination du sol a eu un effet sur tous les indicateurs de la qualité biologique du sol (fig. 23). En effet, la biomasse microbienne, le rapport C/N, la respiration microbienne (exprimée par la quantité de C-CO₂, le taux de germination des graines ainsi que l'élongation racinaire du maïs ont été sensibles à la présence des carburants. La différence observée pour tous ces paramètres entre le sol contaminé et le témoin a été hautement significative. Le taux de germination obtenu dans le sol non contaminé est proche de 100 % alors qu'il n'a pas atteint 20 % dans le sol contaminé, soit une inhibition d'environ 80 %. La respiration microbienne, la biomasse et l'élongation racinaire du maïs obtenus dans le sol témoin ont été plus élevés par rapport au sol contaminé. Le rapport C/N, quant à lui, est plus élevé dans le sol contaminé que dans le sol non contaminé. Ces résultats indiquent que l'activité biologique est plus intense dans le sol non contaminé et que la germination et la croissance racinaire sont meilleures dans ce sol.

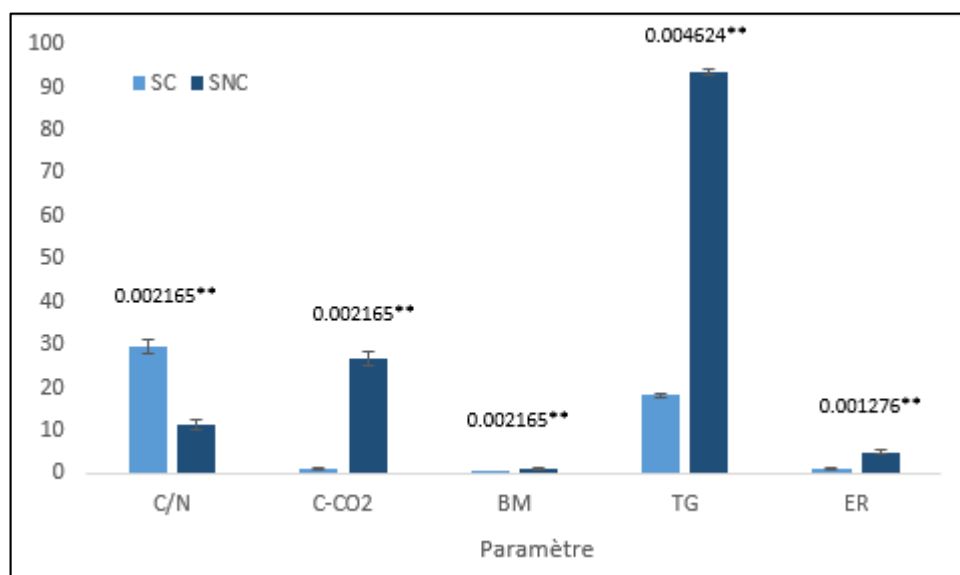


Fig. 23. Effet de la contamination sur les indicateurs de la qualité biologique du sol

La matrice de corrélation des indicateurs de la qualité biologique du sol (tableau 12) montre qu'il y a des corrélations significatives entre ces paramètres deux à deux. Ces corrélations sont positives entre le taux de germination des graines de maïs, l'élongation racinaire, la respiration et biomasse microbiennes. Cependant la corrélation est négative, mais significative entre le rapport C/N et les autres paramètres.

Tableau 12. Matrice de corrélation entre les indicateurs de la qualité biologique du sol

	C/N	C-CO2	BM	TG	ER
C/N	1.0000000	-0.9323285	-0.9187344	-0.9606560	-0.9259035
C-CO2	-0.9323285	1.0000000	0.9020237	0.9897831	0.9424321
BM	-0.9187344	0.9020237	1.0000000	0.9228161	0.8854122
TG	-0.9606560	0.9897831	0.9228161	1.0000000	0.9485930
ER	-0.9259035	0.9424321	0.8854122	0.9485930	1.0000000

Notons que les coefficients de corrélation les plus élevés sont observés entre le taux de germination et les autres paramètres. Ainsi, celui-ci peut être utilisé comme indicateur de la pollution du sol : de faibles valeurs indiquent la présence de la pollution alors que des valeurs élevées indiqueront l'absence ou la présence en faible proportion de la pollution. Le taux de germination reflète les valeurs des autres paramètres.

1.4. Caractéristiques du sol pollué durant les trois années de l'expérimentation

La comparaison entre les propriétés du sol sur les trois années durant lesquelles a été menée la partie expérimentale a montré qu'il n'y a pas de variations significatives des propriétés physiques et chimiques (fig. 24A) et des indicateurs de la qualité biologique du sol (fig. 24B) d'une année à l'autre.

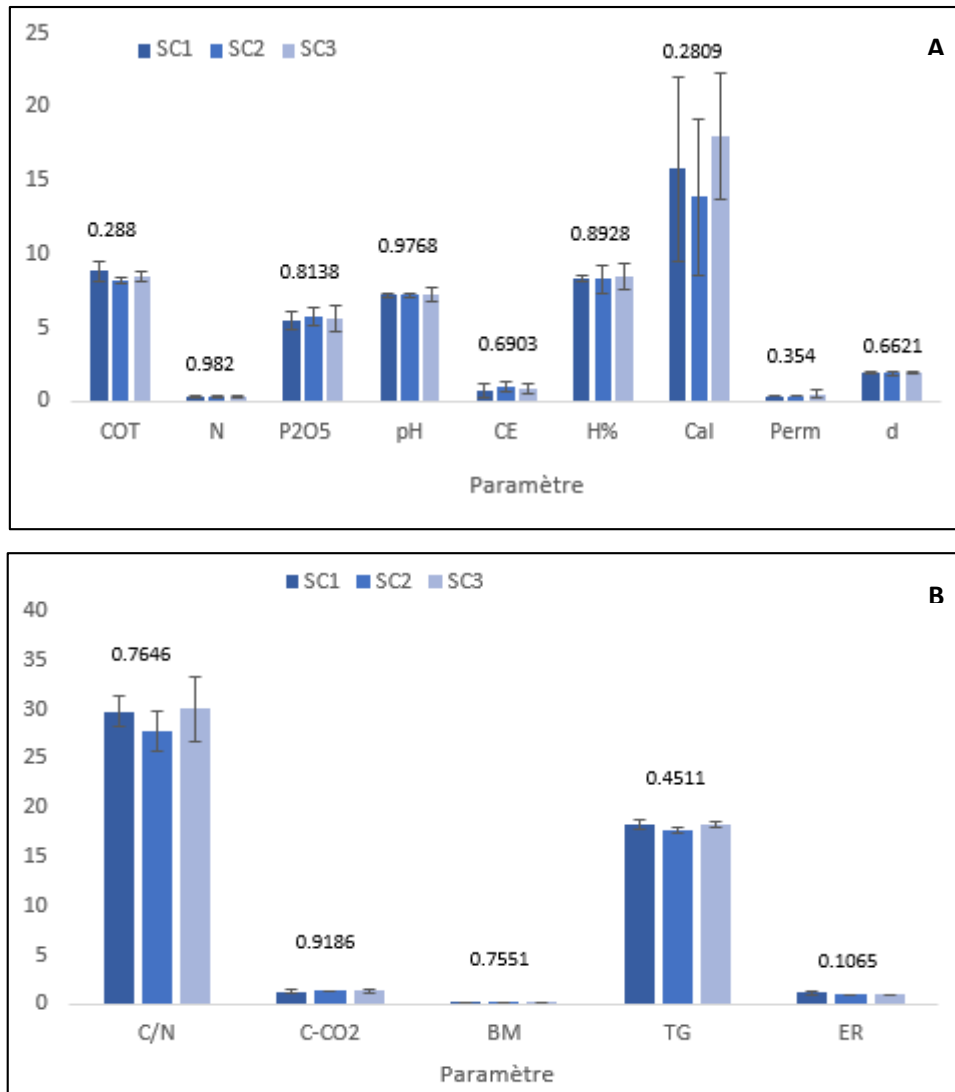


Fig. 24. Variations des propriétés physiques et chimiques du sol (A) et des indicateurs biologiques de qualité (B) au cours des trois années de l'expérimentation

Le dosage des carburants dans le sol a montré que leur quantité n'a pas présenté de variations significatives sur les trois années (fig. 25).

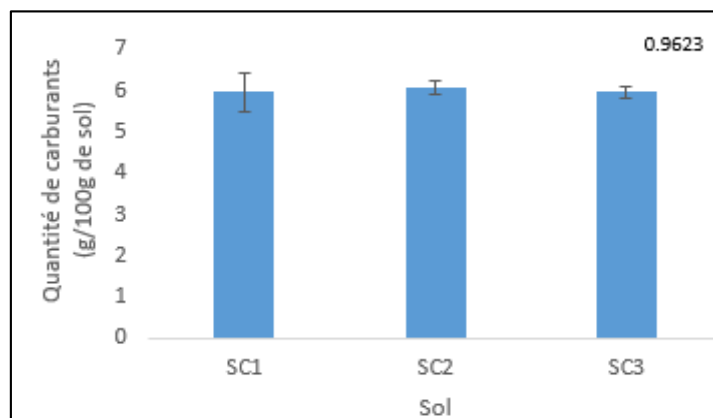


Fig. 25. Variation de la quantité d'hydrocarbures dans le sol entre les trois années de l'expérimentation

Les résultats obtenus pour tous les paramètres étudiés montrent qu'il y a une homogénéité des propriétés du sol sur les trois années de l'expérimentation.

1.5. Discussion

La quantité de carbone organique est plus élevée dans le sol contaminé qui serait due à l'apport de carburants. Des observations analogues ont été faites par Abdul-Ameer Ali (2019) suite à la contamination du sol de surface par le pétrole brut. Ces contaminants sont constitués majoritairement d'hydrocarbures qui sont des substances organiques qui sont donc très pourvues en carbone (Fattal, 2008). D'après Chitour (1983), les produits pétroliers renferment 84 à 87 % de carbone. C'est ce qui explique aussi le fait que les quantités d'azote, de phosphore et de calcaire ne soient pas influencées par la présence de ces substances qui ne peuvent pas représenter des sources importantes de ces éléments dans le sol. Selon Abdul-Ameer Ali (2019), la présence du pétrole dans le sol n'a pas affecté sa teneur en calcaire et en azote.

La conductivité électrique d'une solution du sol est un indice des teneurs en sels solubles dans ce sol. Nous avons constaté que la contamination n'a pas eu d'effet sur la conductivité électrique du sol, ce qui indique que les carburants n'ont pas enrichi le sol en sels solubles. Même dans le cas où les hydrocarbures constituant les carburants auraient subi une transformation, celle-ci n'aurait pas abouti à la libération de substances minérales, car c'est seulement dans ce cas qu'il y a enrichissement du sol en sels comme l'a noté Khajehnouri (2011).

Le pH du sol contaminé a été inférieur à celui du sol non contaminé, ce qui concorde avec les résultats de Zahermand et al. (2020). La diminution du pH dans le sol contaminé laisse supposer que les hydrocarbures subissent des transformations dans le sol. D'après Bergue et Merienne (1986), Margesin et Schinner (2001) et Njuko et al. (2009), la diminution du pH du sol est due à la production d'acides organiques lors de leur transformation. D'après Bergue et Merienne (1986) il y a une légère acidification des sols contaminés par les hydrocarbures (de 2 à 3 dixièmes) qui traduit l'apparition de faibles quantités d'acides résultant soit de l'oxydation des n-alcanes, soit de celle de composés provenant de la rupture de noyaux aromatiques.

L'augmentation de l'humidité dans le sol contaminé serait due à la réduction de l'évaporation de l'eau et de la perméabilité à cause de l'hydrophobicité des hydrocarbures, ce qui augmenterait la rétention en eau du sol. La perte réduite de la transpiration et la réduction du taux d'absorption de l'eau dans le sol ont comme conséquence l'augmentation de l'humidité du

sol. La teneur en eau d'un sol pollué aux hydrocarbures peut être supérieure de 2% à celle d'un sol non pollué (Bergue et Merienne, 1986).

Aussi, la présence des hydrocarbures dans le sol augmente sa densité (Koller, 2004 ; Zahermand et al., 2020), ce qui pourrait avoir comme conséquence la réduction de sa perméabilité. Sakshi et al. (2019) ont également constaté une réduction de la perméabilité dans le sol pollué aux hydrocarbures du type HAP.

Par ailleurs, la comparaison des quantités de carburants dans le sol durant la période expérimentale a montré que ce paramètre ne présentait pas de variations dans le temps. Des observations similaires ont été faites par Rhabal et al. (2010) qui ont indiqué que la concentration des hydrocarbures dans le sol était plus élevée en surface et que cette concentration restait stable dans le temps.

La respiration des microorganismes du sol et leur biomasse ont été sensibles à la contamination du sol par les carburants. Siddiqui et al. (2001) ont constaté que dans un sol contaminé au gasoil, la croissance des microorganismes était réduite. Les concentrations mesurées dans le sol contaminé sont fortes (>3%), ce qui aurait diminué l'activité et la biomasse des microorganismes. Duchauffour (1991) note que seules les concentrations inférieures à 2 % n'exercent pas d'effet dépressif sur la microflore du sol. Aussi, Li et al. (2021) ont montré que des concentrations de gasoil de 2,5 à 3% réduisaient les types et le nombre de bactéries dans le sol. D'après Sakshi et al. (2019), les modifications des propriétés du sol par la contamination aux hydrocarbures déprécient sa qualité et réduisent la diversité au sein des populations microbiennes.

En outre, la plupart des hydrocarbures contenus dans l'essence et le gasoil sont légers, ce qui facilite leur absorption par les organismes vivants du sol. Ces fractions légères sont les plus toxiques pour les microorganismes comme signalé par Colin (2000) car elles ont un effet solvant sur les membranes (Morgan et al., 1989).

D'après Labud et al. (2007) la présence de l'essence a inhibé la biomasse microbienne et l'activité enzymatique du sol. De plus, un effet phytotoxique a été observé sur la germination des graines d'orge et de ray grass par le gasoil et le pétrole brut.

Enfin, la différence de l'intensité des pics correspondant aux groupements fonctionnels des hydrocarbures montre que ces groupements sont minimales dans le sol témoin qui n'est pas pollué. Les pics observés dans le sol contaminé correspondent aux familles d'hydrocarbures contenues dans l'essence et le gasoil. En effet, d'après Marchal et al. (2003), ces carburants

contiennent des alcanes, des iso-alcanes et des alcènes qui sont des fractions labiles. L'intensité plus importante des fonctions alcools est due au fait que la transformation des hydrocarbures aboutit à la formation des alcools tel que signalé par Gaudu (2014). Ces auteurs ont décrit le processus de transformation des hydrocarbures qui suit les étapes :



Le sol pollué présente, donc, des rapports C/N et C/P élevés et une biomasse microbienne diminuée. Les techniques biologiques à appliquer pour le décontaminer devraient se baser sur la correction du déficit des nutriments et sur l'enrichissement du sol en microorganismes aptes à dégrader les carburants.

2. Sélection des plantes tolérantes aux carburants

L'un des traitements biologiques retenus pour décontaminer le sol pollué est la phytoremédiation. Mais pour que cette technique puisse être efficace, il faut utiliser une espèce végétale qui tolère la pollution aux carburants. Un bio-essai a été entrepris au laboratoire (hors site) en utilisant huit espèces appartenant aux familles des Fabacées et des Poacées afin de sélectionner la plus tolérante d'entre elle. Un essai a été réalisé sur le site pollué afin de confirmer les résultats obtenus en laboratoire.

2.1. Culture hors site

Les résultats sont présentés sous forme de graphes représentant le taux d'inhibition moyen accompagné de son écart-type pour chaque paramètre, le résultat de la comparaison des moyennes (P-value) et les groupes homogènes donnés par le test post-hoc.

Les résultats des paramètres végétatifs des huit espèces végétales expérimentées (fig. 26) montrent que les fabacées ont été plus tolérantes vis-à-vis de la pollution du sol par les carburants. Dans ce sens, la fève paraît particulièrement intéressante puisque c'est l'espèce dont la croissance a été la moins inhibée par la pollution.

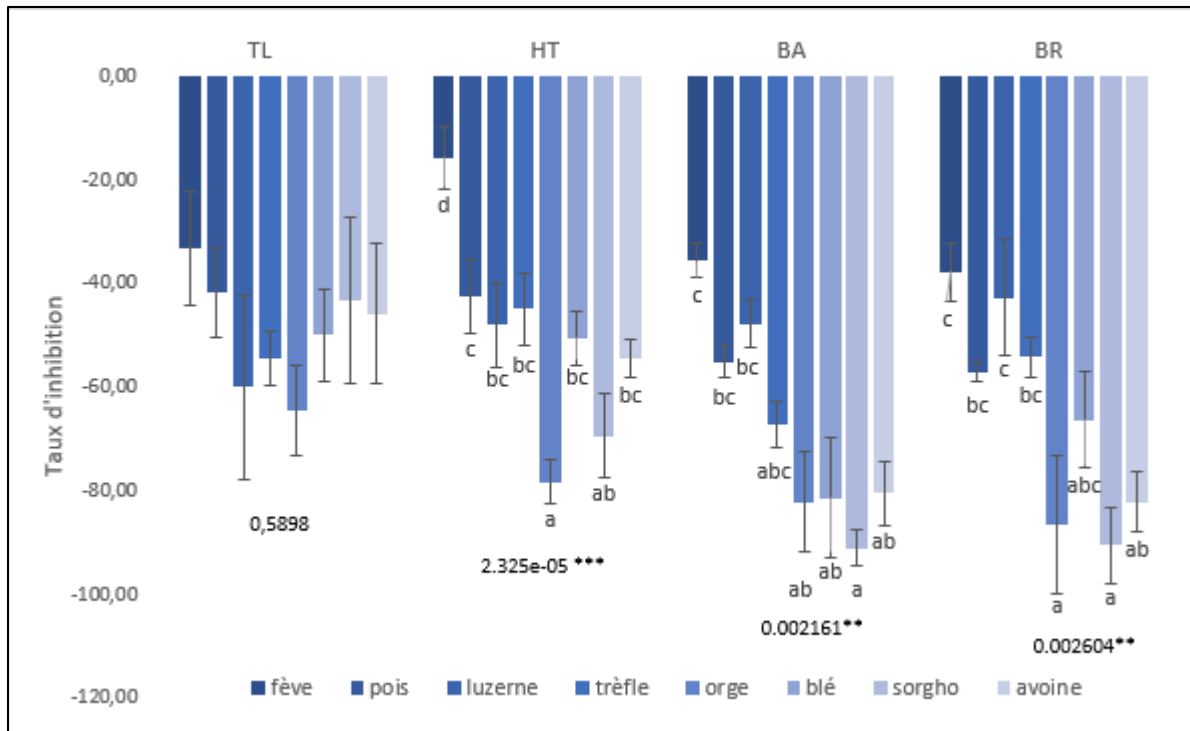


Fig. 26. Taux d'inhibition des paramètres végétatifs des plantes dans les essais hors site

TL : taux de levée
HT : hauteur de la tige

BA : biomasse aérienne
BR : biomasse racinaire

2.1.1. Taux de levée

La présence des carburants dans le sol contaminé a inhibé le taux de levée des huit espèces testées (fig. 26). Toutefois, il n'y a pas eu de différences significatives entre les espèces. D'une façon générale, qu'il s'agisse de Fabacées ou de Poacées, la levée a été affectée au même degré. Ceci laisse supposer que la germination des graines a été sensible à la présence des carburants dans le sol. Les taux d'inhibition observés vont d'un peu plus de 33% chez la fève à près de 65% chez l'orge, soit environ le double.

2.1.2. Hauteur de la tige

Les résultats représentés par la figure 26 montrent que la croissance en hauteur des plantes a également été affectée par la pollution du sol aux carburants. L'inhibition la plus faible de la croissance en hauteur des tiges a été enregistrée sur les plants de fève puis sur ceux du pois. L'inhibition de la croissance des tiges de la luzerne, du trèfle, du blé et de l'avoine n'a pas été significativement différente. Les plants d'orge et de sorgho ont eu la croissance la plus faible sur le sol pollué comparativement à celle enregistrée dans le sol non pollué.

Le taux d'inhibition de la croissance en hauteur de la tige enregistré chez la fève représente environ un tiers du taux d'inhibition des trois autres Fabacées, un quart du taux d'inhibition de la croissance en hauteur du blé, du sorgho et de l'avoine et un peu plus d'un cinquième de celui de l'orge.

2.1.3. Biomasse aérienne

Un effet dépressif de la contamination du sol par les carburants a été observé sur la biomasse aérienne des plants des huit espèces végétales. L'espèce la moins affectée par la pollution est la fève suivie du pois et de la luzerne puis du trèfle (fig. 26). Une forte inhibition a été observée chez le sorgho. Il ressort des résultats que les espèces appartenant à la famille des Fabacées ont eu un meilleur développement des tiges et des feuilles dans le sol pollué par rapport aux espèces de la famille des Poacées qui se sont révélées être plus sensibles vis-à-vis de cette pollution. Le rapport du taux d'inhibition de la croissance des parties aériennes de la fève à celui de la luzerne et à celui du trèfle est d'environ un tiers et un demi respectivement. Ce taux représente près de deux cinquièmes de celui des espèces de Poacées.

2.1.4. Biomasse racinaire

La figure 26 illustre l'effet de la contamination du sol par les carburants sur la biomasse racinaire des espèces végétales testées. La contamination a inhibé significativement la croissance des racines exprimée par la biomasse racinaire. Cette inhibition s'est surtout manifestée sur les Poacées. Le blé a été la céréale la moins affectée par la pollution. Les Fabacées ont été plus tolérantes puisque l'inhibition de la croissance racinaire a été plus faible. L'espèce la moins sensible à cette pollution a été la fève suivie de la luzerne puis du pois et du trèfle. La valeur du taux d'inhibition de la croissance racinaire de la fève est très proche de celle du pois, mais avoisine le tiers de celles des Fabacées fourragères, les deux cinquièmes de celle de l'orge, de l'avoine et du sorgho et les trois cinquièmes de celle du blé.

2.1.5. Nombre de nodules

Les résultats représentés par la figure 27 montrent que le nombre de nodules a diminué dans le sol pollué pour toutes les espèces avec des taux d'inhibition allant de 52,79 chez le pois à 88,33 chez le trèfle. Mais cette inhibition s'est manifestée au même degré chez les quatre espèces de Fabacées. Ceci indique que les carburants présents dans le sol ont eu un effet dépressif important sur la nodulation des racines des espèces testées.

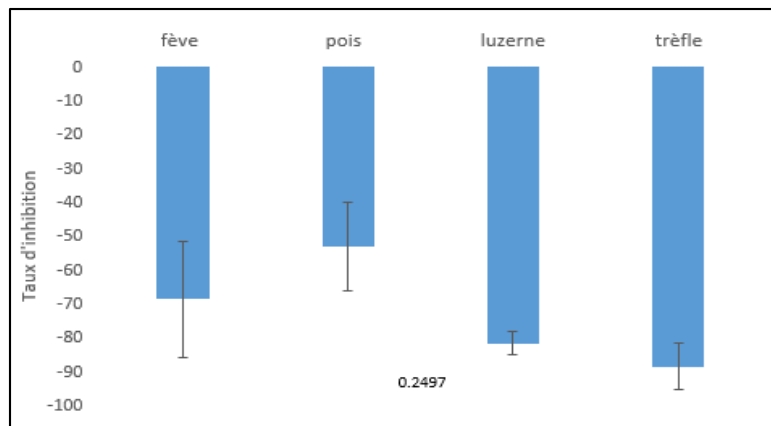


Fig. 27. Taux d'inhibition de la nodulation des racines des Fabacées

2.2. Culture sur site

Les résultats des essais de laboratoire ont fait ressortir que les Fabacées ont été les plus tolérantes à la pollution du sol par les carburants. C'est pour cela que deux espèces d'entre elles ont été retenues pour les essais de terrain : la fève comme Fabacée potagère et la luzerne comme Fabacée fourragère. Les résultats seront représentés dans des graphes avec la moyenne et l'écart-type de chaque paramètre, le résultat du test de comparaison de moyennes et les groupes établis par le test post-hoc correspondant.

Une comparaison a été faite entre les paramètres végétatifs de ces deux espèces dans l'essai hors site et ceux de l'essai sur site. Il en ressort que la luzerne n'a pas pu pousser sur le terrain, alors que la fève a donné des résultats meilleurs que ceux obtenus dans l'essai hors site.

2.2.1. Taux de levée

Les résultats du taux de levée des plants de fève et de luzerne dans les essais de laboratoire et de terrain sont représentés par la figure 28. Le taux de levée obtenu sur le site pour la fève (75,25%) a été significativement plus élevé que celui obtenu hors site (58,33%). La densité des plants de fève était plus élevée sur le terrain.

Par contre, les plants de luzerne n'ont pas pu lever dans l'essai de terrain, ce qui diffère significativement des résultats de l'essai mené hors site.

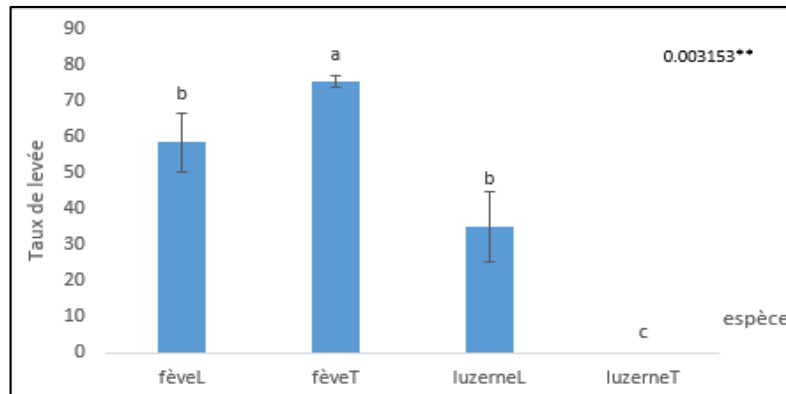


Fig. 28. Taux de levée de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site

2.2.2. Hauteur de la tige

La comparaison de la croissance en hauteur des plants de fève cultivés au laboratoire et sur le terrain a montré que la hauteur de la tige de la fève dans l'essai sur site (70,43) est proche de celle obtenue dans l'essai hors site (58,03) (fig. 29).

Concernant la luzerne, elle n'a pas poussé dans les conditions de terrain, aucun plant n'a levé. Par conséquent, il n'y avait pas de plants sur lesquels la mesure de la hauteur de la tige pouvait être faite.

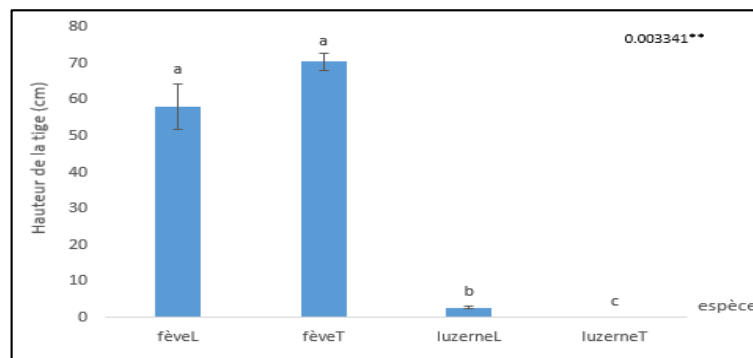


Fig. 29. Hauteur des tiges de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site.

2.2.3. Biomasse aérienne

Les biomasses aériennes obtenues pour la fève dans les conditions de laboratoire et celles du terrain ont été significativement différentes. La biomasse aérienne a doublé dans la culture sur site par rapport à la culture en pot (8,88 et 17,37 mg respectivement) (fig. 30). La croissance des parties aériennes de cette espèce est meilleure dans l'essai mené sur site. La fève a donc montré une plus grande tolérance à la pollution aux carburants sur site.

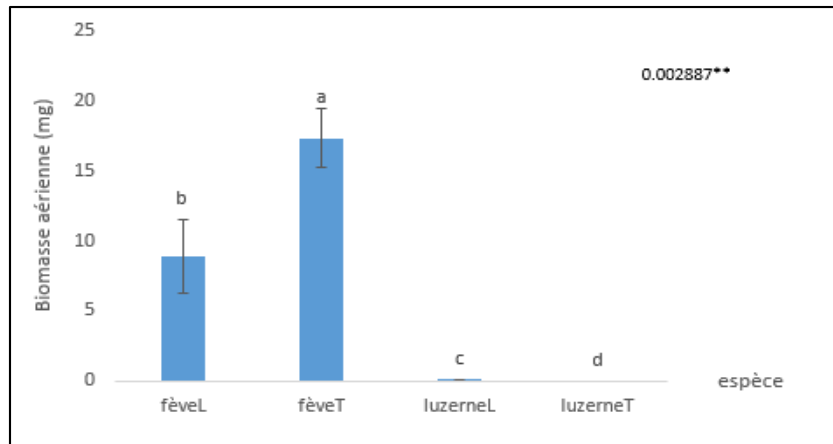


Fig. 30. Biomasse aérienne de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site

2.2.4. Biomasse racinaire

La valeur de la biomasse racinaire de la fève (fig. 31) a été significativement plus élevée dans l'essai sur site (5,67 mg) par rapport à celle obtenue dans l'essai hors site (3,7 mg).

Les racines étant enfouies dans le sol, elles sont au contact direct avec le polluant ce qui ne semble pas affecter la croissance des racines de la fève.

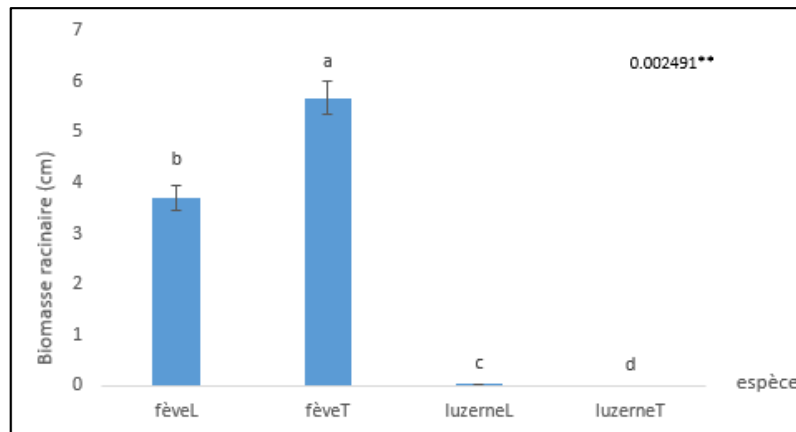


Fig. 31. Biomasse racinaire de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site

2.2.5. Nombre de nodules

Le nombre de nodules sur les racines des plants de fève cultivée sur le terrain était supérieur à celui de la culture en pot (fig. 32). La fixation symbiotique de l'azote serait donc plus importante sur le terrain que dans l'essai de laboratoire.

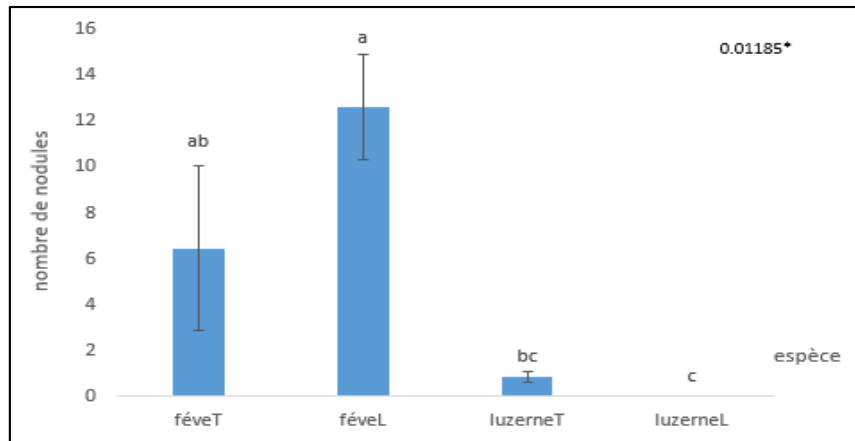


Fig. 32. Nombre de nodules de la fève et de la luzerne dans les essais hors site et sur site

2.3. Discussion

Les résultats ont montré que la levée des huit espèces végétales testées a été inhibée par la présence des hydrocarbures dans le sol. Ceci serait dû à l'inhibition de la germination des graines par toxicité directe ou indirecte. Siddiqui et al. (2001) ont aussi observé que le gasoil inhibait la germination des graines de plantes pérennes. D'après Chaineau et ses collaborateurs (1997), les hydrocarbures peuvent entrer dans les graines, empêcher les réactions métaboliques et tuer l'embryon par une toxicité aigüe directe. La modification des propriétés du sol peuvent être à l'origine de cette inhibition, notamment l'augmentation de l'humidité qui peut causer la pourriture des graines.

Les hydrocarbures ont eu également un effet inhibiteur sur la croissance des plantes exprimé par une réduction de la hauteur des tiges et une diminution des biomasses aérienne et racinaire. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Somtrakoon et Chouychai (2013), qui ont rapporté que la croissance des tiges et des racines étaient la plus sensible aux hydrocarbures, et à ceux de Chaineau et al. (1997), qui ont noté que l'effet toxique des hydrocarbures sur les parties aériennes et racinaires se traduit par un retard important de croissance (diminution de la hauteur de la plante, du nombre de feuilles, de la longueur des racines, etc.), entraînant une diminution du poids sec. Selon Haider et al. (2021), les hydrocarbures réduisent la germination des graines et l'assimilation des nutriments, induisent un stress oxydatif, perturbent les activités métaboliques et inhibent la physiologie et le développement morphologique, aboutissant au stade ultime à la réduction du rendement végétal. Une diminution de la teneur en pigments caroténoïdes et une augmentation des chlorophylles a et b ont été signalées par Denisova et al. (2019).

Les résultats observés peuvent être dus à l'effet des hydrocarbures sur la disponibilité des éléments nutritifs et sur les propriétés du sol. La réduction de la biomasse végétale dans les sols contaminés aux hydrocarbures peut être due à l'effet dépressif que ces derniers peuvent exercer sur les caractéristiques physico-chimiques du sol. Njuko et al. (2009) ont noté que la pollution du sol par les hydrocarbures entraînait une faible perméabilité et une faible infiltration de l'eau dans le sol, ce qui affecte le développement des racines. Selon Henner et al. (1999), c'est la présence dans le sol d'hydrocarbures de faible poids moléculaire, volatils et solubles qui induit une inhibition de la germination des graines et la croissance des plantes.

La diminution de la croissance racinaire peut être due aux propriétés hydrophobes des hydrocarbures qui peuvent limiter l'effet bénéfique de l'association plante-microorganisme. Ces dommages causés aux racines ne permettent pas à la plante d'augmenter sa surface de contact avec le substrat de culture pour optimiser sa nutrition.

La structure des racines pourrait également être affectée par les hydrocarbures. En effet, selon Bellout et al. (2016), les racines cultivées dans un sol pollué par des hydrocarbures présentent une différenciation inhabituelle du xylème, avec des vaisseaux plus petits.

Dans ce sens, Heller et al. (1998) ont noté que la réduction de la biomasse était directement liée au sol, qui est la source d'une grande partie des éléments nécessaires au développement des plantes. Chaineau et al. (1997) ont associé la réduction de la croissance des plantes lors d'une contamination du sol par les hydrocarbures, au déficit de nutriments causé par la présence de ces polluants. Giddens (1976) a noté que, quelle que soit la concentration en hydrocarbures, la croissance des plantes était réduite en raison de la diminution de l'assimilation de l'eau et des nutriments et au changement des propriétés du sol.

Toutefois, les espèces testées n'ont pas montré la même sensibilité aux carburants. D'une manière générale, les fabacées ont été plus tolérantes vis-à-vis de cette pollution. La fève a été la moins sensible avec une croissance moins affectée que les autres espèces. La luzerne s'est distinguée par une assez faible inhibition de la biomasse racinaire comparativement au pois et au trèfle ainsi que les Poacées. Selon Duchaufour (2001), Somtrakoon et Chouychai (2013) et Denisova (2019), la phytotoxicité des hydrocarbures dépend des espèces végétales.

Par ailleurs, la nodulation des racines des légumineuses a été inhibée par la pollution du sol aux carburants qui pourrait exercer une toxicité sur les microorganismes symbiotiques du sol. En effet, d'après Dommergues et Mangenot (1970), les hydrocarbures peuvent avoir un effet sur

les microorganismes du sol tels que les germes cellulolytiques, ammonificateurs, nitrificateurs et fixateurs d'azote.

Dans les essais sur site, la luzerne n'a pas levé à cause probablement de l'absence de la germination des graines. Ces résultats seraient dus aux conditions climatiques et environnementales du site, ce qui a induit l'absence de la levée, contrairement aux essais effectués au laboratoire dans des conditions plus ou moins contrôlées. Des observations similaires ont été faites par Vila (2006) dans les sols contaminés.

Concernant la fève, elle a montré une meilleure croissance dans l'essai mené sur site par rapport à l'essai de laboratoire. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les conditions climatiques sur site sont plus propices à la germination et à la croissance de cette espèce. Ces observations pourraient également être expliquées par le fait que sur site, la dissipation des hydrocarbures est plus importante. En effet, selon Feng et al. (2019) et Liu et al. (2021), l'atténuation naturelle est le processus dominant dans la dissipation des hydrocarbures conduisant à la diminution de leurs quantités sans qu'aucune technique de décontamination ne soit appliquée.

Le passage dans les plantes et leur stockage dans les feuilles constitue également un moyen de dissipation de ces polluants (Feng et al., 2019).

Liu et al. (2021) notent que les hydrocarbures à faible poids moléculaire se volatilisent facilement de la surface du sol, surtout lorsque l'humidité de celui-ci n'est pas élevée.

3. Production de tensioactifs

La bioaugmentation aussi est l'une des techniques envisagée, en injectant dans le sol contaminé une suspension bactérienne. La souche à utiliser dans ce traitement est sélectionnée parmi cinq souches testées. Le critère de sélection est l'aptitude de ces souches à produire des tensioactifs car ces substances leur permettent d'accéder plus facilement aux polluants, leur conférant ainsi un avantage par rapport aux souches concurrentes. La production des tensioactifs et l'évaluation de leur qualité se fait par la mesure de la tension superficielle, l'indice E_{24} et le rendement de production de ces substances.

3.1. Tension superficielle

La réduction de la tension superficielle dans un milieu indique la présence de substances tensioactives. La figure 33 montre que la tension superficielle dans tous les moûts de fermentation était inférieure à 43mN/m. Ces valeurs sont toutes inférieures à la tension

superficielle du milieu de culture stérile qui est de 61,41. Les valeurs les plus faibles de la tension de surface ont été obtenues dans les milieux contenant les souches du genre *Pseudomonas* avec des valeurs proches de 35 mN/m, ce qui représente quasiment la moitié de la tension mesurée dans le milieu stérile. La tension superficielle la plus élevée (42,3) a été observée dans le moût de fermentation de *Bacillus cereus*.

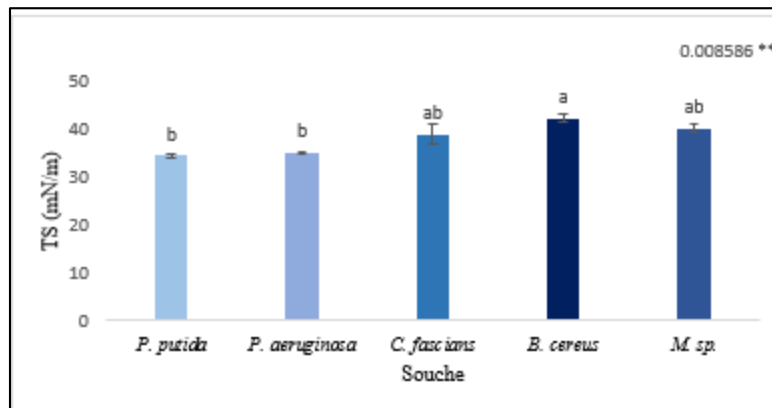


Fig. 33. Tension de surface des moûts de fermentation des souches bactériennes

3.2. Indice d'émulsification E₂₄

La figure 34 illustre les résultats de calcul de l'indice d'émulsification induits par l'activité des souches bactériennes testées. Il ressort de ces résultats que la valeur la plus élevée du E₂₄ a été obtenue dans le milieu de *C. fascians* (43 %) suivie par *Micrococcus. sp.* La souche *B. cereus* a donné l'indice le plus faible (31,9 %).

Les souches *P. putida* et *P. aeruginosa* sont caractérisées par un indice d'émulsification de l'ordre de 36 %.

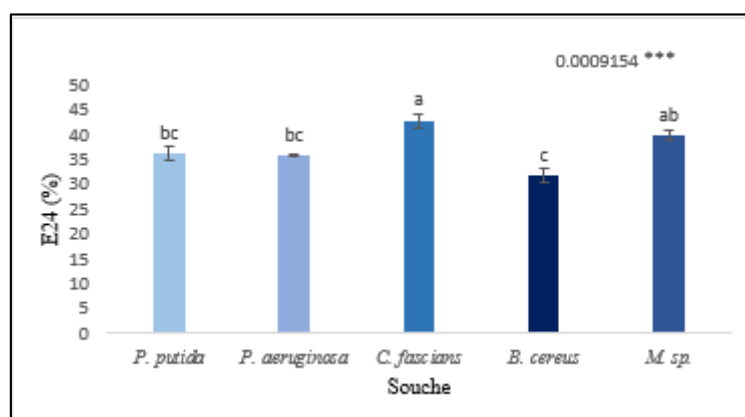


Fig. 34. Indice d'émulsification des tensioactifs produits par les souches bactériennes

3.3. Rendement de la production des tensioactifs

Le rendement de production des tensioactifs par les deux souches de *Pseudomonas* était nettement supérieur à celui des trois autres souches avec des valeurs proches de 3g de tensioactif/g de biomasse (fig. 35). *B. cereus* a eu rendement environ 3,5 fois plus faible que celui des *Pseudomonas*. Les souches *Micrococcus sp.* et *C. faciens* ont eu des rendements très faibles (inférieurs à 0,2). Les souches de *Pseudomonas* sont plus efficaces dans la production de tensioactifs. Une masse donnée de cellules bactérienne de ces souches produit presque 3 fois son poids de tensioactifs.

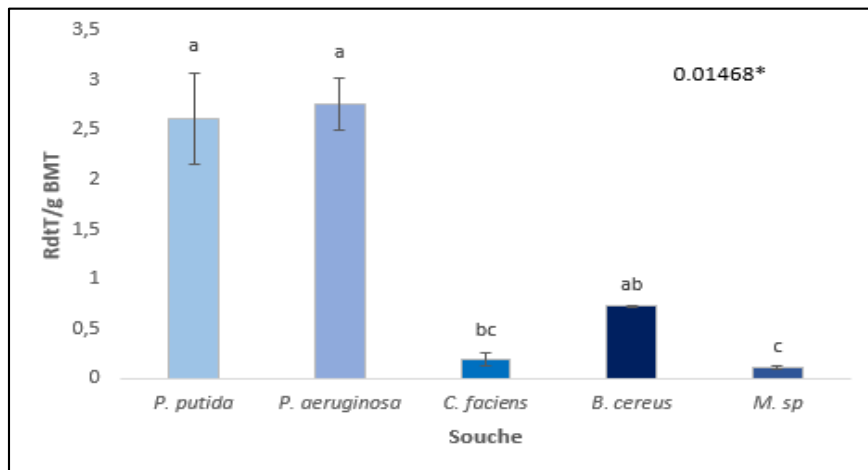


Fig. 35. Rendement de la production de tensioactifs par les souches bactériennes

3.4. Discussion

La tension de surface est un critère de production et de qualité des substances tensioactives. On estime que les tensioactifs sont puissants s'ils réduisent de moitié la tension superficielle du milieu. Ce critère est vérifié dans les moûts de fermentation des souches de *Pseudomonas*.

D'une manière générale, la production de substances tensioactives est associées aux bactéries du genre *Pseudomonas* (Persson et Molin, 1987 ; Jennings et Taner, 2000) en particulier *P. aeruginosa* (Reiling et al., 1986 ; Pruthi et Cameotra, 1995 ; Pimienta et al., 1997 ; El Sheshtawy et Doheim, 2014) et *P. putida* (Pruthi et Cameotra, 1995, Tuleva et al., 2002 ; Martinez-Toledo et Rodriguez-Vazquez, 2013 ; Janek et al., 2013 ; Arnold et al., 2019) avec un rendement élevé de production.

Les valeurs de TS obtenues pour les autres souches indiquent qu'elles ont aussi produit des tensioactifs ayant des propriétés comparables à celles d'un tensioactif synthétique (Tween 80).

Des études ont démontré l'aptitude à produire des tensioactifs par des souches de *Micrococcus* (Yilmaz et al., 2009 ; Tuleva et al., 2002), par *B. cereus* (Velazquez-Ardillas, 2011 ; Da Silva et al., 2018 ; Hsueh et al., 2020) et par des souches de *Corynebacterium* (Rahman et al., 2003).

L'indice d'émulsification E_{24} est un indicateur de qualité des tensioactifs car il reflète leur aptitude à former des émulsions stables.

Les valeurs obtenues sont toutes supérieures à 30 % ; valeur qui représente la limite de l'efficacité d'une émulsion selon Abu Ruwaida et al. (1991).

Les tensioactifs possédant de bonnes qualités émulsifiantes, tels que celui produit par *Escherichia fergusonii* et isolé par Sriram et al. (2011) et celui produit par *Lactobacillus delbrueckii* et isolé par Thavasi et al. (2011) sont adéquats pour une application dans la décontamination des milieux pollués aux hydrocarbures.

La souche *P. aeruginosa* produit un biosurfactant rhamnolipidique ayant la capacité de diminuer la tension superficielle de l'eau de 72 à 33,9 mN/m (Yin et al., 2009), et celle du tampon phosphate de 71 à 31 mN/m (Chopra et al., 2020) avec une concentration micellaire critique (CMC) de 50 mg/L (Yin et al., 2009) et un indice d'émulsification de 53,57% (Khamis et al., 2020). L'expérience d'émulsification menée par Yin et al. (2009) a indiqué que ce biosurfactant émulsionnait efficacement le pétrole brut. Les mesures de la tension superficielle ont démontré qu'il possédait aussi une activité de surface stable à des gammes variables de pH et de salinité. Le biosurfactant a également présenté de bonnes performances de solubilisation du phénanthrène avec une solubilité environ 23 fois plus élevée du phénanthrène dans l'eau que le témoin.

Liu et al. (2018) présentent l'utilisation du tensioactif produit par *P. aeruginosa* comme procédé prometteur dans la remédiation des sols pollués par les hydrocarbures.

Selon Kanna et al. (2014), le tensioactif produit par *P. putida* est également un rhamnolipide qui peut abaisser la tension superficielle du milieu de 74 à 35 mN/m. Il est très stable, résistant aux variations de pH, de température, à la salinité et à la présence d'ions métalliques.

4. Optimisation mathématique

Les résultats de l'activité biologique, de la biomasse microbienne et du taux de germination des graines de maïs sont présentés sous forme de moyennes plus ou moins l'écart-type. Les résultats de l'optimisation mathématique permettent de déterminer dans la population générée par l'AG,

la classe d'individus caractérisés par les valeurs optimales des paramètres testés. Les résultats de l'optimisation sont présentés par des graphes de l'ACP et de la classification hiérarchique, suivis par des tableaux exposant la composition des classes de solutions optimales.

4.1. Optimisation de la biostimulation

L'optimisation mathématique permet de déterminer la classe d'individus caractérisés par les doses de fertilisants et les durées de biostimulation optimales, c'est-à-dire les individus qui donnent les meilleurs taux de germination des graines de maïs.

4.1.1. Activité biologique

L'efficacité de la biostimulation a été évaluée en fonction de la quantité de CO₂ émise exprimée par C-CO₂ (carbone minéral). La quantité de dioxyde de carbone émis par la microflore autochtone dans les échantillons biostimulés a augmentée avec le temps. La meilleure activité biologique a été observée après 6 et 8 semaines (tableau 12). Les valeurs de C-CO₂ les plus élevées ont été mesurées dans le sol fertilisé avec la concentration N3P3 suivie de celles trouvées dans le sol traité avec la concentration N4P4. La plus petite valeur de C-CO₂ a été obtenue dans le sol qui a reçu la concentration la plus faible (N1P1) incubé pendant seulement 4 semaines. Il conviendrait de souligner que lorsque la concentration des engrais augmente, la durée du traitement diminue pour avoir la même efficacité, mais globalement, pour un traitement de 4 semaines ou plus, l'augmentation de la dose d'engrais n'a pas nécessairement conduit à une activité biologique plus intense.

4.1.2. Biomasse microbienne :

La biomasse microbienne du sol augmente avec les doses croissantes d'engrais jusqu'à la troisième concentration puis diminue légèrement dans le sol traité au N4P4. Des doses plus élevées ont stimulé la croissance des micro-organismes parce qu'ils ont disposé de plus de nutriments. Dans tous les cas, l'augmentation de la durée du traitement a induit une augmentation de l'activité microbienne (tableau 13). Cette valeur a presque doublé à chaque fois que la durée augmentait de deux semaines, en particulier pour les concentrations d'engrais les plus élevées (N3P3 et N4P4).

Tableau 13. Effet des concentrations des fertilisants et de la durée du traitement sur l'activité et la biomasse microbiennes et sur le taux de germination des graines de maïs.

Traitement	Taux de germination (%)	Biomasse microbienne (mg/100g sol)	Activité microbienne (mgC-CO ₂ /100g sol)
T1N1P1	62,0 ± 2,14	0,28 ± 0,01	18,33 ± 1,35
T1N2P2	68,33 ± 0,88	0,35 ± 0,03	26,4 ± 1,55
T1N3P3	83,5 ± 1,05	1,21 ± 0,05	43,75 ± 0,83
T1N4P4	80,66 ± 1,28	0,905 ± 0,04	38,1 ± 1,37
T2N1P1	74 ± 0,81	0,425 ± 0,06	36,81 ± 1,01
T2N2P2	72,66 ± 0,95	1,134 ± 0,1	41,4 ± 0,65
T2N3P3	85,33 ± 1,05	2,475 ± 0,22	61,6 ± 0,53
T2N4P4	83,33 ± 1,25	1,425 ± 0,1	52,6 ± 1,47
T3N1P1	73,33 ± 1,4	0,28 ± 0,01	33,7 ± 0,74
T3N2P2	81,5 ± 1,05	1,78 ± 0,05	52,33 ± 0,45
T3N3P3	95,66 ± 1,14	5,035 ± 0,25	66,73 ± 0,71
T3N4P4	87,83 ± 1,1	2,595 ± 0,08	57,33 ± 0,4
T4N1P1	75,33 ± 2,96	1,28 ± 0,1	43,45 ± 0,48
T4N2P2	81,83 ± 0,87	2,57 ± 0,21	57,81 ± 0,61
T4N3P3	90 ± 1,48	3,88 ± 0,13	63,06 ± 0,8
T4N4P4	90,83 ± 1,4	5,835 ± 0,35	76,55 ± 3,84

4.1.3. Germination des graines :

Lorsque les hydrocarbures sont dégradés suffisamment, le sol devient moins toxique pour les organismes et pour les semences. Ainsi, l'amélioration de la germination des graines indique que la toxicité a diminué dans le sol. La toxicité des hydrocarbures dans le sol a été déterminée par l'inhibition de la germination des graines (tableau 2).

Après 4 semaines, le taux de germination était inférieur à 75% dans les échantillons traités avec N1P1 et N2P2. Il a dépassé 80% après 4 semaines dans les sols traités avec les concentrations N3P3 et N4P4, et pour toutes les concentrations testées après 6 et 8 semaines exceptée la première concentration. Le taux de germination observé après 8 semaines dans les sols ayant reçu la dose N4P4 et après 6 semaines avec la concentration de N3P3 dépassait 90 %. Dans ces sols l'inhibition de la germination des graines était inférieure à 10 %, indiquant une très faible toxicité due à la dissipation des hydrocarbures. La toxicité dans le sol a diminué au cours de l'incubation, mesurée par la germination des graines. Il faut noter que la valeur la plus élevée du TG (plus de 95%) a été obtenu dans l'échantillon traité avec N3P3 après 6 semaines.

4.1.4. Optimisation mathématique

Etant donnée la bonne corrélation entre le taux de germination du maïs avec l'activité et la biomasse microbiennes, il a été utilisé dans l'optimisation mathématique comme indicateur de

l'efficacité de l'expérience de biostimulation qui reflète la restauration de la qualité biologique du sol. Il représente la variable à optimiser.

Les régressions multiples calculées pour expliquer l'évolution du taux de germination des graines de maïs en fonction de la durée et la concentration des engrais sont données dans le tableau 4.

Les faibles valeurs de probabilité indiquent que les deux les modèles de régression (tableau 14) sont significatifs. Le coefficient de détermination a montré que la qualité de l'ajustement était très bonne). Les modèles de régression ont été optimisés à l'aide d'algorithmes génétiques. La fonction fitness vise à obtenir des solutions qui ont donné des taux de germination de plus de 70%. Les individus de la population générés par l'algorithme génétique sont soumis à une analyse en composantes principales représentée par la figure 36.

Tableau 14. Régressions calculées pour le taux de germination en fonction des concentrations de fertilisants et de la durée du traitement

Variables explicatives	Modèle de régression	Coefficient de détermination (R^2)	p-value
Durée du traitement et concentration de $(NH_4)_2SO_4$	$TG=2,9933C_N + 1,92T + 55,3$	0,83	$4,95.10^{-12}$
Durée de traitement et concentration de K_2HPO_4	$TG=24,785C_P + 1,92T + 55,3$	0,83	$4,95.10^{-12}$

Le taux de germination est plus corrélé avec la concentration d'engrais qu'avec la durée du traitement. La concentration d'engrais est négativement corrélée avec la durée du traitement. Ainsi, lorsqu'une concentration plus élevée d'engrais est appliquée, il faut moins de temps pour améliorer le taux de germination.

Dans le premier modèle, l'individu qui a donné le taux de germination optimal était le 10ème, caractérisé par une concentration en engrais azoté d'environ 3,975g/100g de sol et une durée de 6 semaines. Dans le deuxième modèle, le meilleur individu était le 26ème, caractérisé par une concentration d'engrais phosphaté de 0,405g/100g de sol et une durée d'environ 6,75 semaines.

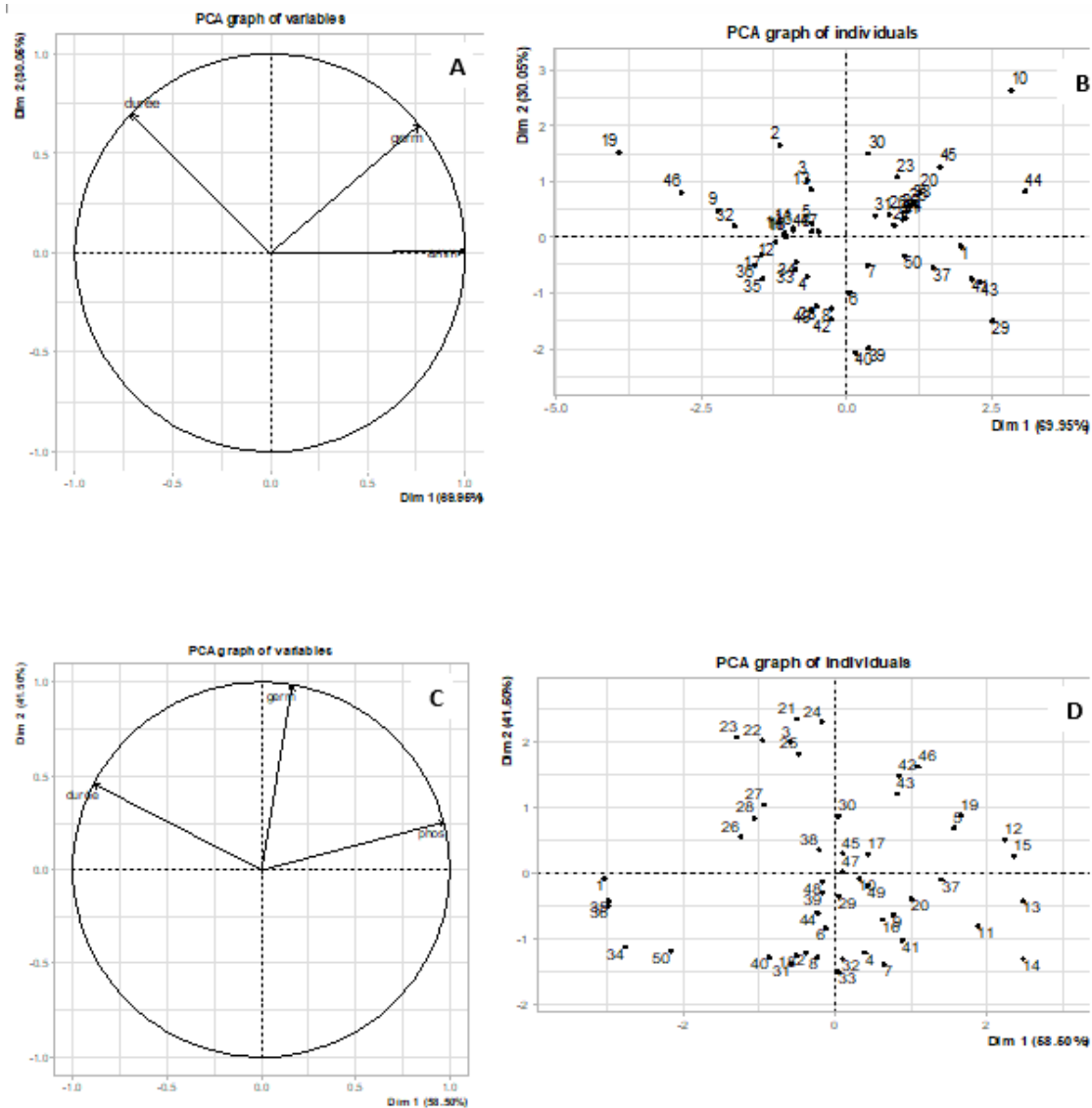


Fig. 36. Analyse en composantes principales. Distribution des Variables (A) et individus (B) pour le premier modèle. Distribution des Variables (C) et individus (D) pour le deuxième modèle.

Les dendrogrammes (Fig. 37) montrent que les solutions se rapprochant de la solution optimale dans le premier modèle sont contenus dans la 2^{ème} classe contenant seulement trois individus (tableau 14) et ceux du second modèle sont contenus dans la 1^{ère} classe contenant 26 individus (tableau 15).

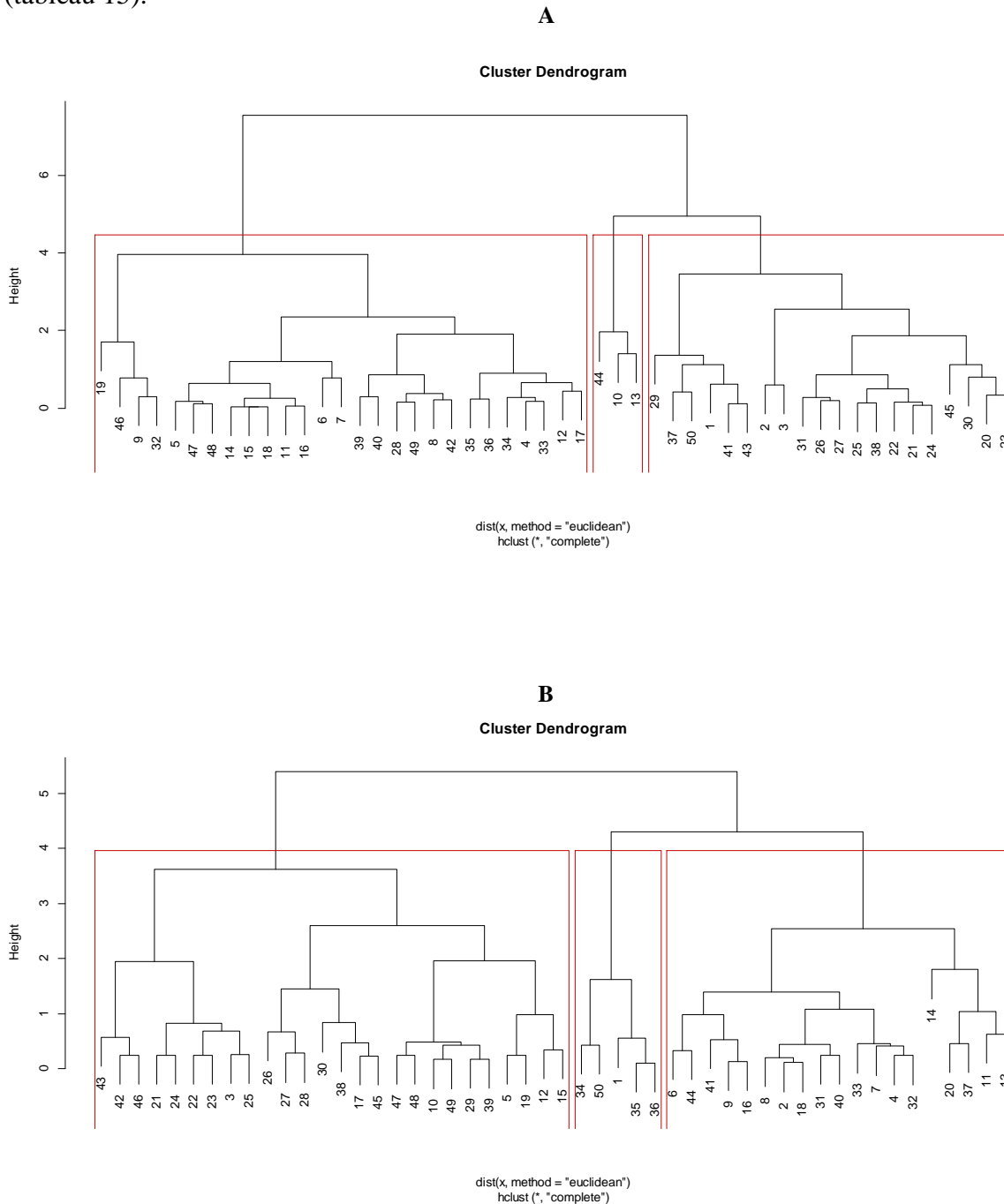


Fig. 37. Classes d'individus caractérisés par la durée du traitement et les concentrations du fertilisant azoté (A), ou par la durée du traitement et les concentrations du fertilisant phosphaté (B).

Les caractéristiques des solutions optimales du premier modèle sont données dans le tableau. Ces individus sont caractérisés par un taux de germination dépassant 89%, une concentration de l'engrais azoté d'environ 8g/100g de sol et une durée de traitement entre 5 et 6 semaines.

Tableau 15. Caractéristiques des solutions optimales du premier modèle

Durée	C _N	TG
6,04	7,95	90,68
5,01	8,06	89,02
6,59	7,85	89,4

Les caractéristiques des solutions optimales du deuxième modèle sont données dans le tableau. Ces individus sont caractérisés par un taux de germination supérieurs à 84%, des concentrations en fertilisant phosphaté entre 0,64 et 0,91g/200g de sol et une durée de traitement comprise entre 4,11 et 7,16 semaines.

Tableau 16. Caractéristiques des solutions optimales du deuxième modèle

Durée	C _p	TG
6,65	0,79	87,76
4,64	0,9	86,51
5,18	0,81	85,32
4,11	0,94	86,39
3,93	0,94	86,1
5,25	0,82	85,8
4,66	0,91	86,76
6,75	0,81	88,24
6,91	0,77	87,73
7,16	0,75	87,74
6,5	0,83	88,23
6,5	0,8	87,55
5,05	0,82	85,2
6,4	0,64	86,5
6,5	0,73	85,85
6,5	0,76	86,52
6,5	0,75	86,24
5,24	0,79	84,94
5,76	0,81	86,46
5,72	0,79	85,79
5,41	0,78	85,96
5,47	0,87	87,38
5,36	0,86	87,02
5,48	0,8	85,76
5,35	0,89	87,6
5,37	0,8	85,41
5,49	0,78	85,19

4.2. Optimisation de la bioaugmentation

L'objectif de cette optimisation est de déterminer la classe d'individus caractérisés par les densités de la suspension bactérienne et les durées de bioaugmentation optimales pour obtenir les meilleurs taux de germination des graines de maïs.

4.2.1. Activité biologique

La quantité de dioxyde de carbone dégagé lors de la respiration des microorganismes dans le sol traité par bioaugmentation en y injectant une suspension bactérienne de *P. aeruginosa* a augmentée avec le temps. La meilleure activité biologique a été observée après 6 et 8 semaines avec la densité de suspension bactérienne de 100% et après 6 et 8 semaines avec la densité de 75% (tableau 16). Les valeurs les plus faibles de C-CO₂ ont été observées dans le sol ayant été traité avec une suspension de densité de 50%. Toutefois, l'activité biologique dans ce sol a été proportionnelle à la durée de l'incubation. Enfin, nous constatons qu'au-delà de 6 semaines d'incubation, l'activité biologique du sol traité par bioaugmentation s'améliore de façon très nette.

4.2.2. Biomasse microbienne

D'une façon générale, la biomasse microbienne du sol traité par ajout de cellules bactériennes augmente avec les densités de cette dernière. La biomasse la plus importante a été obtenue dans le sol traité avec 100% de la suspension bactérienne après 6 et 8 semaines de traitement. Nous constatons aussi que la biomasse microbienne du sol augmente avec la durée de l'incubation (tableau 17).

Tableau 17. Effet des densités de la suspension de *P. aeruginosa* et de la durée du traitement par bioaugmentation sur l'activité et la biomasse microbiennes et sur le taux de germination des graines de maïs.

Densité	Durée	Taux de germination (%)	Biomasse microbienne (mg/100g sol)	Activité biologique (mgC-CO ₂ /100g sol)
D1	T1	20 ± 7,07	0,22 ± 0,05	21,78 ± 2,49
D1	T2	28,33 ± 8,66	0,68 ± 0,16	32,19 ± 2,63
D1	T3	58,33 ± 9,35	0,88 ± 0,26	41,16 ± 4,23
D2	T1	36,11 ± 7,82	0,83 ± 0,52	35,03 ± 4,92
D2	T2	47,22 ± 4,41	1,84 ± 0,43	45,58 ± 4,33
D2	T3	70,56 ± 8,82	1,82 ± 0,85	55,94 ± 8,57
D3	T1	52,22 ± 11,49	1,87 ± 0,78	39,10 ± 5,29
D3	T2	67,78 ± 5,65	2,09 ± 0,82	56,33 ± 4,29
D3	T3	82,78 ± 9,05	4,37 ± 0,63	67,31 ± 7,41

4.2.3. Germination des graines

Le taux de germination des graines de maïs (tableau 16) a été inférieur à 60% dans les sols traités avec 50% de la suspension bactérienne quelle que soit la durée de l'incubation et dans les sols traités respectivement avec des densités de 75% pendant 4 et 6 semaines et 100% pendant 4 semaines. Les taux de germination les plus élevés (plus de 60%) ont été observés dans les sols ayant reçu une densité de 75% pendant 8 semaines et une densité de 100% pendant 6 et 8 semaines. Après 8 semaines, le taux de germination a même dépassé 80%, avec une inhibition inférieure à 20% indiquant la diminution de la toxicité dans ce sol.

4.2.4. Optimisation mathématique

La fonction à optimiser dans le traitement par bioaugmentation a été calculée par une régression multiple illustrant la relation entre le taux de germination des graines de maïs expliquée par la densité de la suspension bactérienne et la durée de l'incubation. Cette relation est évaluée par l'équation :

$$TG = 0,6519 (\text{densité}) + 8,4259 (\text{durée}) - 48,24074$$

Ce modèle est significatif puisque la probabilité calculée est inférieure au seuil d'erreur. Le coefficient de détermination a montré que la qualité de l'ajustement est très bonne. Le modèle de régression a été optimisé à l'aide d'algorithmes génétiques. La fonction fitness visant à obtenir des solutions qui ont donné des taux de germination de plus de 70%, et une population de 50 individus (solutions) a été demandée. Les individus de cette population sont soumis à une analyse en composantes principales représentée par la figure 38.

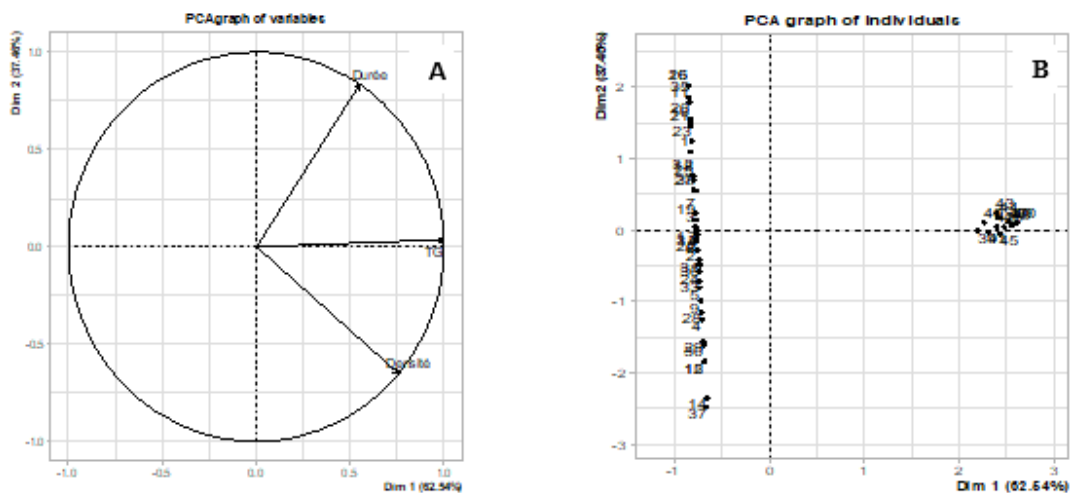


Fig. 38. Analyse en composantes principales. Distribution des variables (A) et individus (B) pour le modèle de la bioaugmentation.

Le taux de germination était corrélé aussi bien avec la densité de la suspension bactérienne qu'avec la durée du traitement. Cependant, il n'existe pas de corrélation entre la densité de la suspension bactérienne et la durée du traitement dans la population générée par les AGs.

Par ailleurs, l'individu qui a donné le taux de germination optimal était le 50ème, caractérisé par une densité de la suspension d'environ 99,95% et une durée de traitement d'environ 7,95 semaines. Le dendrogramme (Fig. 39) montre que cet individu figure dans la première classe, dans laquelle se trouvent toutes les solutions ayant donné des taux de germination supérieurs à 80%. Cette classe contient donc les solutions optimales pour la bioaugmentation (tableau 17).

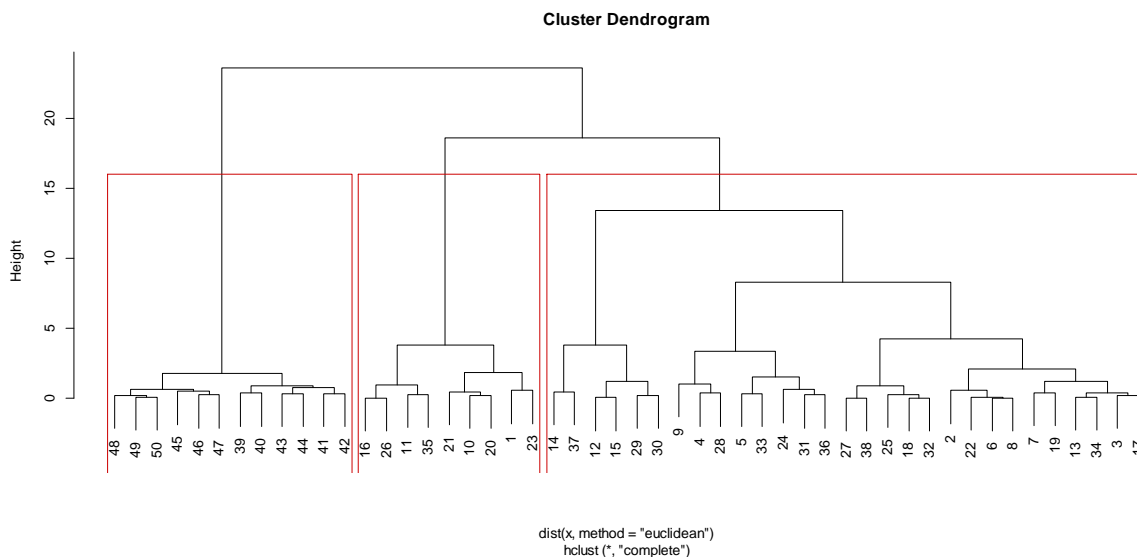


Fig. 39. Classes d'individus caractérisés par la durée du traitement de bioaugmentation et la densité de la suspension bactérienne.

Les individus contenus dans la classe 1 (tableau 18) sont caractérisés par une densité supérieure à 98,5% et une durée de traitement de près de 8 semaines (supérieure à 7,5).

Tableau 18. Composition de la classe 1 du modèle du taux de germination en fonction de la densité de la suspension bactérienne et de la durée du traitement.

Densité	Durée	TG
99,00	7,84	82,33
98,71	7,89	82,57
99,38	7,85	82,71
99,47	7,89	83,06
98,68	7,95	83,08
99,01	7,94	83,18
99,98	7,86	83,20
99,76	7,90	83,36
99,67	7,93	83,58
99,95	7,92	83,66
99,95	7,93	83,78
99,95	7,95	83,87

4.3. Optimisation de la phytoremédiation

Dans cette optimisation, on cherche à déterminer la classe d'individus caractérisés par les doses de semis de la fève et les durées de la phytoremédiation optimales qui auront donné les meilleurs taux de germination des graines de maïs.

4.3.1. Activité biologique

La quantité de C-CO₂ libéré par la respiration microbienne dans le sol traité par phytoremédiation, a augmentée avec le temps. En effet, quelle que soit la dose de semis, la respiration microbienne était plus intense après 8 semaines de traitement. La meilleure activité biologique a été observée au-delà de 6 semaines dans les sols ayant reçu 170 et 226 graines/m². La respiration microbienne a augmenté avec la dose de semis jusqu'à 226 graines/m² puis a baissé dans sol ayant reçu une dose de 283 graines/m² (tableau 18). Les valeurs les plus faibles de C-CO₂ ont été observées dans le sol ayant été traité avec la fève semée à une densité de 57graines/m².

4.3.2. Biomasse microbienne

La biomasse microbienne du sol traité par culture de la fève augmente avec les densités de semis jusqu'à la quatrième dose (226 graines/m²). Une légère baisse a été observée dans le sol ayant été semé avec une densité de 283 graines/m². La valeur la plus élevée a été observée dans le sol semé avec une dose de 226 graines/m² après 8 semaines d'incubation. Concernant les doses de semis de 170 et de 226 graines/m², la biomasse microbienne a été la plus élevée de tous les échantillons après 6 et 8 semaines de traitement (tableau 19).

Tableau 19. Effet des doses de semis de la fève et de la durée du traitement par phytoremédiation sur l'activité et la biomasse microbiennes et sur le taux de germination des graines de maïs.

Dose de semis	Durée	Taux de germination (%)	Biomasse microbienne (mg/100g sol)	Activité biologique (mgC-CO ₂ /100g sol)
DS1	D1	42,5 ± 11,46	0,26 ± 0,05	20,71 ± 3,79
DS1	D2	62,5 ± 6,61	0,61 ± 0,13	27,00 ± 6,3
DS1	D3	71,67 ± 3,82	0,47 ± 0,25	24,01 ± 2,82
DS2	D1	65,83 ± 2,89	0,68 ± 0,66	36,01 ± 1,98
DS2	D2	66,67 ± 1,44	1,79 ± 0,54	41,85 ± 0,84
DS2	D3	70,83 ± 3,82	2,52 ± 0,97	47,27 ± 4,63
DS3	D1	69,17 ± 1,44	1,63 ± 0,87	33,67 ± 2,99
DS3	D2	73,33 ± 1,44	2,41 ± 0,59	49,11 ± 3,8
DS3	D3	85,00 ± 2,5	4,25 ± 1,04	62,57 ± 3,55
DS4	D1	71,67 ± 3,82	2,01 ± 0,41	36,85 ± 2,09
DS4	D2	74,17 ± 2,89	3,07 ± 0,41	52,28 ± 4,45
DS4	D3	90,00 ± 4,33	4,87 ± 0,34	64,94 ± 4,88
DS5	D1	65,83 ± 1,44	1,99 ± 0,57	29,54 ± 2,29
DS5	D2	66,67 ± 1,44	2,54 ± 0,67	44,26 ± 6,83
DS5	D3	70,83 ± 1,44	3,79 ± 0,48	60,75 ± 7,62

4.3.3. Germination des graines

Le taux de germination des graines de maïs a été proportionnel à la durée d'incubation (tableau 18). En effet, pour toutes les doses de semis testées, nous avons constaté que la germination était meilleure en prolongeant le traitement. Ce taux a dépassé 70% après 8 semaines de traitement pour toutes les doses de semis. Il est à noter que la germination des graines de maïs était supérieure ou égale à 85% dans les sols ayant reçu 170 et 226 graines/m² après 8 semaines de culture avec des taux d'inhibition respectifs de 15 et 10%. Les taux de germination les plus faibles ont été obtenus dans les sols traités avec la densité de semis de 57 graines/m² après 4 et 6 semaines de traitement.

4.3.4. Optimisation mathématique

La fonction à optimiser dans le traitement par phytoremédiation a été calculée par une régression multiple illustrant la relation entre le taux de germination des graines de maïs expliquée par la dose de semis de la fève et la durée de l'incubation. Cette relation est évaluée par l'équation :

$$TG = 0,05053(\text{dose}) + 3,66667 (\text{durée}) + 39,19751$$

Ce modèle est significatif puisque la probabilité calculée est inférieure au seuil d'erreur. Le coefficient de détermination a montré que la qualité de l'ajustement est très bonne. Le modèle de régression a été optimisé à l'aide d'algorithmes génétiques. La fonction fitness visant à

obtenir des solutions qui ont donné des taux de germination de plus de 70%, et une population de 50 individus (solutions) a été demandée. Les individus de cette population sont soumis à une analyse en composantes principales représentée par la figure 40.

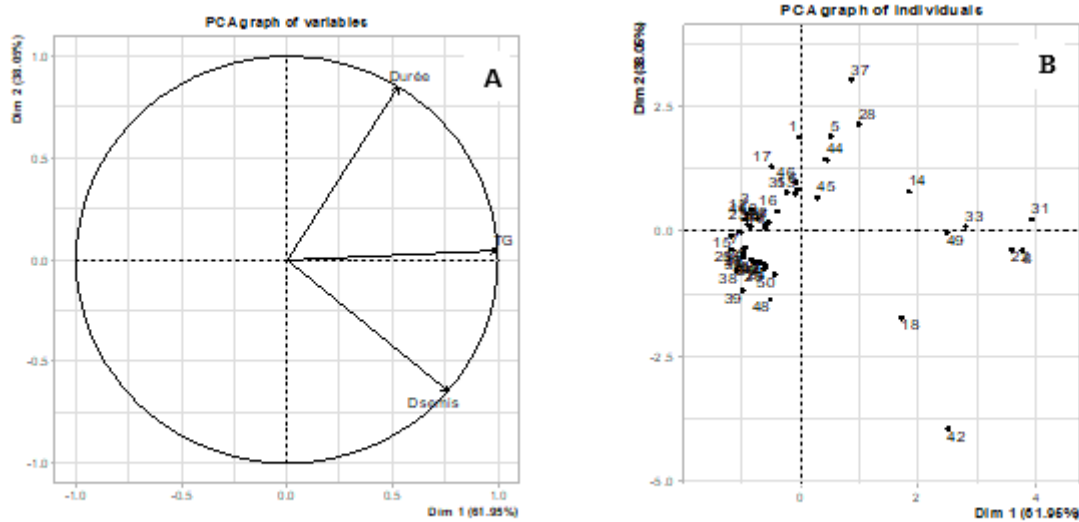


Fig. 40. Analyse en composantes principales. Distribution des variables (A) et individus (B) pour le modèle de la phytoremédiation.

Le taux de germination était corrélé avec la durée de la culture et la dose de semis dans la population générée par les AGs.

L'individu qui a donné le taux de germination optimal était le 31ème, caractérisé par une densité de semis de 166,68 graines/m² et une durée de culture d'environ 7,7 semaines. Le dendrogramme (Fig. 41) montre que cet individu figure dans la troisième classe, dans laquelle se trouvent toutes les solutions ayant donné des taux de germination supérieurs à 73%. Cette classe contient donc les solutions optimales de la phytoremédiation (tableau 19).

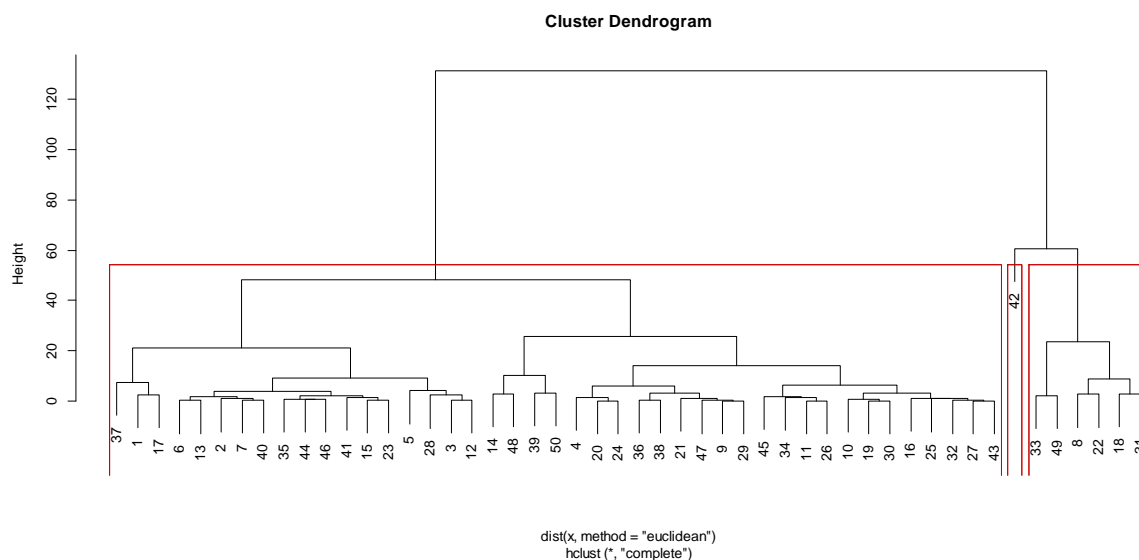


Fig. 41. Classes d'individus caractérisés par la durée du traitement par phytoremédiation et la densité de semis de la fève.

Les individus contenus dans la classe 3 (tableau 20) sont caractérisés par une densité de semis comprise entre 150 et 175 graines/m² et une durée d'incubation entre 7 et 8 semaines.

Tableau 20. Composition de la classe 3 du modèle du taux de germination en fonction de la densité de semis et de la durée de la culture.

Densité	Durée	TG
174,37	7,53	75,64
165,83	6,99	73,23
171,62	7,52	75,45
166,68	7,70	75,86
152,74	7,54	74,57
150,65	7,47	74,21

4.4. Discussion

L'application de la biostimulation avec des nutriments inorganiques a eu un effet favorable sur la respiration microbienne, et donc, sur la minéralisation du carbone (Braddock et al., 1997 ; Margesin et Schinner, 2001 ; Ghaly et al., 2013 ; Wu et al., 2017 ; Roy et al., 2018). La biomasse microbienne était plus importante (Margesin et Schinner, 2001 ; Abid et al., 2014 ; Wu et al., 2017 ; Bahmani et al., 2018 ; Koshlaf, 2019). Plusieurs études ont corrélé la perte en hydrocarbures avec la biomasse et l'activité microbiennes. Noel et al. (2016) ont démontré, par les techniques isotopiques, que la majeure partie du CO₂ émis provenait de la biodégradation des hydrocarbures.

Siles et Margesin (2018) ont montré qu'un taux d'élimination élevé d'hydrocarbures pétroliers totaux était obtenu après ajout au sol contaminé de fertilisants inorganiques. Safdari et al. (2018) ont trouvé un pourcentage de dégradation d'hydrocarbures d'environ 82%. Abid et al. (2014) ont noté qu'il y avait une relation entre le nombre de bactéries du sol et le taux d'élimination des hydrocarbures pétroliers totaux.

Yaman (2020) a également constaté que la biostimulation d'un sol pollué par des hydrocarbures entraînait une réduction de 74% des hydrocarbures pétroliers totaux avec un nombre de bactéries dégradantes deux fois plus élevé que dans le sol témoin.

La dégradation de l'essence et du gasoil dans le sol par les bactéries indigènes stimulées a amélioré la germination des graines de maïs, puisque le sol était moins toxique. La durée optimale de biostimulation était d'environ 6 semaines. Ces résultats sont en accord avec ceux de Wu et al. (2016), qui ont observé une perte de 60 % des hydrocarbures pétroliers totaux 6 semaines après l'application de la biostimulation, avec un plateau de dégradation au cours de la septième semaine. Un plateau a été également observé par Rostami et al. (2013) autour la cinquième semaine d'incubation à 25°C d'un sol amendé par les nutriments. Margesin et Schinner (2001) ont également noté que l'élimination des hydrocarbures baissait avec le temps en raison d'une formation probable de composés polaires et de la perte de composés labiles qui ont conduit à une baisse de l'activité microbienne. L'optimisation par algorithmes génétiques des quantités d'engrais a donné des concentrations optimales de 3,975g et 0,405g/100g de sol de sulfate d'ammonium et de phosphate dipotassique respectivement. Celles-ci ne sont pas les concentrations les plus élevées parmi celles qui ont été testées. Des résultats similaires ont été obtenus par Braddock et al. (1997). En effet, ces auteurs ont noté que la plus grande activité microbienne pour le niveau le plus bas de nutriments. Ramasdass et al. (2018) ont noté que l'ajout des engrais à la dose recommandée a entraîné une inhibition importante de la dégradation des hydrocarbures.

Par ailleurs, les concentrations optimales obtenues par l'optimisation par les AG permet d'économiser 0,627kg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 0,36kg de K_2HPO_4 par m^2 de sol sur une profondeur de 20 cm.

Le traitement par bioaugmentation du sol pollué aux carburants a augmenté nettement la biomasse et la respiration microbiennes, et donc la minéralisation du carbone. Des résultats similaires ont été obtenus par Szulc et al. (2014) qui ont constaté que la quantité de CO_2 émis par un sol pollué au diesel a augmenté considérablement pendant 4 semaines par l'ajout de cellules microbiennes. Plusieurs études ont mis en évidence l'amélioration de la biodégradation

des hydrocarbures par l'inoculation de souches bactériennes (Bento et al., 2005 ; Mao et al., 2012 ; Pucci et al., 2013 ; Kumar et al., 2014) notamment les souches de *Pseudomonas* (Rivelli et al., 2013 ; Ghosh et al., 2014). Des auteurs ont noté que la présence de tensioactifs a amélioré l'efficacité de la bioaugmentation (Bayer et al., 2013 ; Szulc et al., 2014 ; Kumar et al., 2014).

L'optimisation par AGs de la bioaugmentation a montré que la densité optimale de la suspension bactérienne de *P. aeruginosa* est proche de 100% et la durée d'incubation du sol est d'environ 8 semaines.

En effet, l'augmentation de la densité de la suspension bactérienne a eu un effet positif sur l'activité biologique, indiquant une meilleure biodégradation des carburants. Mao et al. (2012) ont constaté que lorsque la densité de la suspension avait doublé, le taux d'élimination des hydrocarbures était passé de 20 à 36%.

La durée d'incubation du sol pollué traité par bioaugmentation a influencé également l'activité biologique du sol. En effet, l'activité biologique du sol était plus élevée lorsque l'incubation était prolongée. D'après Szulc et al. (2014), la respiration microbienne était plus importante par rapport à celle du sol non traité par bioaugmentation après 4 semaines d'incubation. Mao et al. (2012) ont rapporté que l'élimination d'une quantité assez importante d'hydrocarbures après près de 8 semaines. Ghosh et al. (2014) ont rapporté que 80% du pyrène était dégradé par *P. aeruginosa* après seulement 2 semaines. Selon Bento et al. (2005), des taux de dégradation supérieurs à 70% ont été obtenus après traitement d'un sol pollué aux carburants par bioaugmentation après 12 semaines d'incubation. Szulc et al. (2014) ont constaté que les souches allochtones, lorsqu'elles sont injectées dans le sol, ont besoin d'un temps d'adaptation qui peut être de 4 semaines.

Le taux de germination des graines de maïs a, également, été amélioré par la bioaugmentation du sol traduisant l'élimination des hydrocarbures, et donc la diminution de la toxicité dans ce sol. L'élimination des carburants dans le sol est liée aussi à la nature des hydrocarbures qu'ils contiennent. L'essence est, selon Zairi et al. (2002), la plus biodégradable suivie du gasoil avec des taux de dégradation respectifs de 50 et 33%.

Les résultats obtenus montrent que la phytoremédiation a été efficace dans la décontamination du sol. Cette efficacité se traduit par une élévation de l'activité et de la biomasse microbiennes, ainsi que par l'amélioration du taux de germination du maïs traduisant la diminution de la toxicité dans ce sol. Des travaux ont rapporté l'efficacité de la phytoremédiation dans l'élimination des hydrocarbures (Chaineau et al., 2000 ; Susarla et al., 2002 ; Atagana, 2011 ;

Liu et al., 2014 ; Martin et al., 2014). Les mécanismes les plus utilisés sont la rhizodégradation /phytostimulation ainsi que l'extraction (Susarla et al., 2002). L'élimination des hydrocarbures peut se faire soit par des enzymes que la plante produit, soit en stimulant l'activité microbienne du sol au niveau de la rhizosphère, par les exsudats racinaires (Martin et al., 2014).

L'augmentation du taux de germination du maïs a été proportionnelle à la dose de semis jusqu'à la dose de 283 graines/m² où l'on a observé une diminution du taux de germination. L'application de doses de semis plus élevées que celles préconisées a permis de pallier l'effet dépressif des hydrocarbures sur la germination. En effet, Chaineau et al. (1997) ont rapporté que la présence des hydrocarbures dans le sol réduisait le taux de germination des graines. Ainsi, pour avoir une population de fève suffisamment dense pour être efficace dans la décontamination du sol, il fallait augmenter la dose de semis.

Par ailleurs, la réduction de la toxicité était d'autant plus importante que la durée de la culture de la fève était élevée. L'optimum donné par les AGs se situe entre 7 et 8 semaines. Liu et al. (2014) ont noté que l'activité enzymatique du sol augmentait considérablement après 8 semaines de culture, avec une réduction de la concentration des HAPs dans le sol.

Toutefois, le taux de germination des graines de maïs obtenu à la fin des trois traitements a été plus important dans le sol traité par biostimulation ou par bioaugmentation que dans le sol traité par phytoremédiation, ces résultats concordant avec ceux de Soleimani et al. (2013).

5. Applications des solutions optimales

L'une des solutions optimales calculées dans la section précédente est appliquée pour chaque technique dans des essais en laboratoire et sur le site contaminé, afin de valider les résultats de l'optimisation mathématique.

5.1. Résultats de la biostimulation

5.1.1. Essai en laboratoire

Dans le sol traité par biostimulation, le taux de germination obtenu était de 86,66%, ces résultats sont proches de ceux obtenus par le modèle. L'utilisation de nutriments et temps de traitement optimisés dans cette expérience a donné des résultats cohérents avec ceux générés par l'AG.

Le C-CO₂ et la biomasse microbienne étaient respectivement d'environ 49mg/100g de sol et 1,92mg/100g de sol (Fig. 42A).

5.1.2. Essai de terrain

Le taux de germination observé était de 88 % pour les graines de maïs et les valeurs obtenues pour le C-CO₂ et la biomasse microbienne étaient respectivement d'environ 48,7 mg/100g de sol et 2,15mg/100g de terre (Fig. 42A). Les résultats de l'expérience sur le terrain étaient légèrement meilleurs que ceux obtenus en laboratoire. Les concentrations optimisées d'engrais et la durée du traitement étaient efficaces même sur le terrain.

5.2. Résultats de la bioaugmentation

5.2.1. Essai en laboratoire

L'application de l'une des solutions optimales de la bioaugmentation par l'utilisation d'une suspension de *P. aeruginosa* a abouti à une activité biologique beaucoup plus élevée comparé au sol non traité, avec une valeur de 43,52 mg de C-CO₂/100g de sol. Le résultat obtenu pour la biomasse microbienne était de 2mg/100g de sol. Concernant la germination des graines de maïs, elle a été très bonne avec un taux de 80% (fig. 42B).

5.2.2. Essai de terrain

La même solution optimale a été appliquée sur le sol sur le site pollué. Les résultats obtenus étaient légèrement plus faibles que ceux de l'essai de laboratoire.

La quantité de C-CO₂ obtenue dans l'essai in situ était de 40,88mg/100g de sol et la valeur de la biomasse microbienne était de 2,16. Le taux de germination du maïs a atteint 75% (fig. 42B).

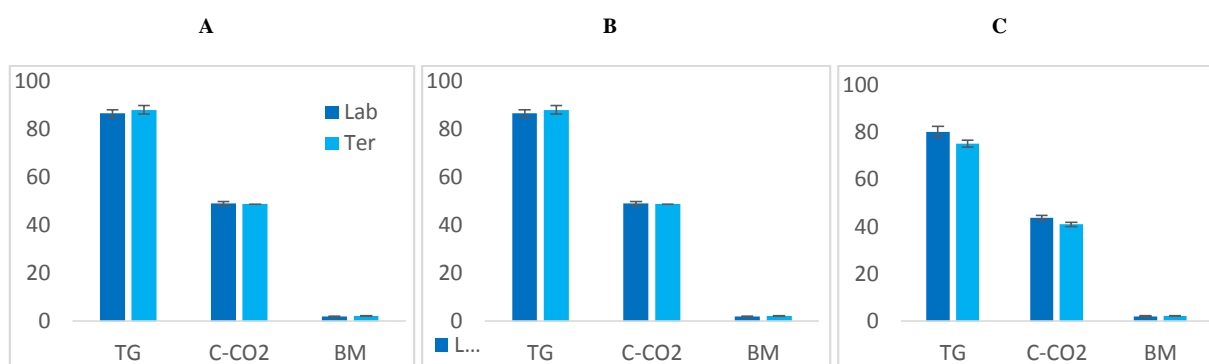


Fig. 42. Résultats de la quantité de C-CO₂, MB et GR après les essais de biostimulation (A), de bioaugmentation (B) et de phytoremédiation (C) de laboratoire et de terrain.

5.3. Résultats de la phytoremédiation

5.3.1. Essai en laboratoire

L'essai mené en laboratoire en appliquant l'une des doses de semis optimales de la fève pendant 8 semaines a donné une valeur de C-CO₂ de 36,5 mg/100g de sol, une biomasse microbienne de 1,59mg/100g de sol et un taux de germination du maïs de 72% (fig. 42C). Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues dans l'essai de laboratoire de la biostimulation et de la bioaugmentation.

5.3.2. Essai de terrain

Sur le site, la culture de la fève avec l'une des solutions optimales calculée par les AGs a donné 35,98mg de C-CO₂ /100g de sol, une biomasse microbienne de 1,8 mg/100g de sol et un taux de germination du maïs de 78% (fig. 42C).

5.4. Combinaison des traitements

Pour mettre en évidence l'efficacité des techniques appliquées, seules ou en combinaison, au sol contaminé, un essai a été mené sur le site pollué. L'efficacité est évaluée par comparaison de ces traitements avec un sol traité par l'atténuation naturelle pour rendre compte de l'apport la dissipation naturelle des carburants.

L'application des solutions optimales de la biostimulation, de la bioaugmentation, de la phytoremédiation et de leurs combinaisons a été améliorée significativement par le traitement combiné (fig. 43).

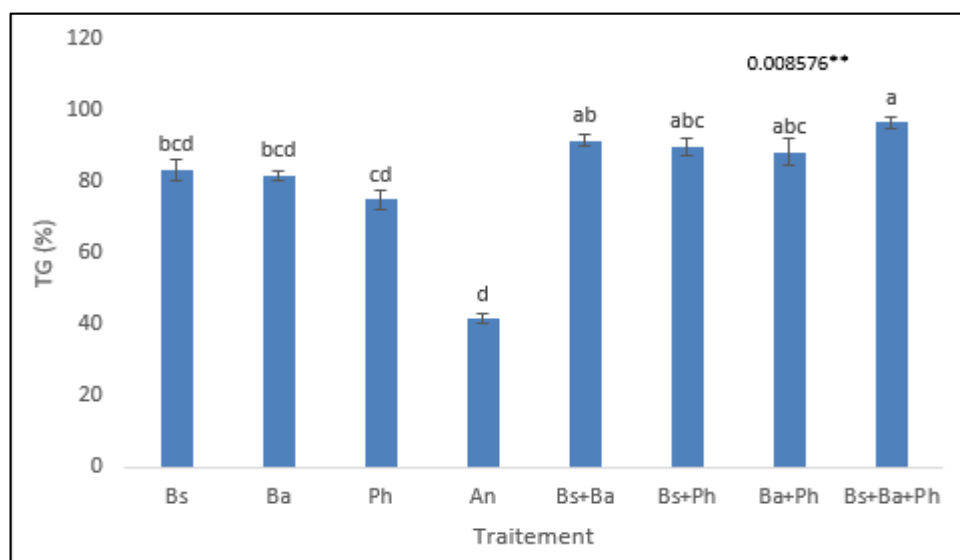


Fig. 43. Comparaison du taux de germination après application sur site des solutions optimales des trois techniques de décontamination, de leurs combinaisons et de l'atténuation naturelle.

Les sols traités par les combinaisons Bs+Ba+Ph, Bs+Ba, Bs+Ph et Ba+Ph et ceux traités par les traitements Bs, Ba et Ph ont été analysés par FTIR. Les spectres IR des sols traités (fig. 44 et 45) montrent que les pics correspondant aux familles d'hydrocarbures présentes initialement dans le sol contaminé sont de moindre intensité que ceux du spectre du sol n'ayant subi aucun traitement (atténuation naturelle). Ces observations montrent que tous les traitements, qu'ils soient appliqués seuls ou en associations ont été efficaces.

Dans le sol traité par l'association des trois techniques, aucun pic n'est observé dans la plage correspondant aux alcènes, ce qui indique que cette fraction a été dégradée.

Il est à souligner que l'atténuation naturelle, bien qu'elle n'ait pas eu la même efficacité que les traitements appliqués, elle a quand même réduit la quantité d'hydrocarbures par rapport au sol contaminé, ceci apparaît sur le spectre IR puisque les pics correspondant aux familles d'hydrocarbures ont été de moindre intensité (Fig. 44).

5.5. Discussion

Les résultats des expériences menées en laboratoire et sur le terrain ont confirmé l'efficacité des solutions optimales calculées par AG. Le taux de germination élevé a montré que le sol dans les deux expériences était moins toxique pour les semences de maïs.

Ces résultats concordent avec ceux de Pelaez et al. (2013) et Song et al. (2014) qui ont observé que les techniques de remédiation (bioaugmentation et biostimulation) étaient aussi efficaces in situ que dans les expériences de laboratoire. Lors et al. (2012) ont même constaté une légère amélioration de l'efficacité de la bioremédiation sur terrain (environ 5%) par rapport aux résultats obtenus au laboratoire. Selon Pelaez et al. (2013), plus de 71 % les hydrocarbures pétroliers totaux ont été dégradés lors d'une expérience de biostimulation sur terrain en moins de 7 semaines. Ces auteurs ont également observé un taux de dégradation de 72,6% en laboratoire après un traitement de biostimulation de 8 semaines. Suja et al. (2014) ont noté que le taux de dissipation des hydrocarbures pétroliers totaux était plus élevé sur le terrain. Cela peut s'expliquer par le fait que les conditions sur le terrain, qui est un système ouvert, soient différentes et la perte en hydrocarbures n'est pas due seulement à la dégradation mais aussi à la volatilisation (Lu et al., 2021).

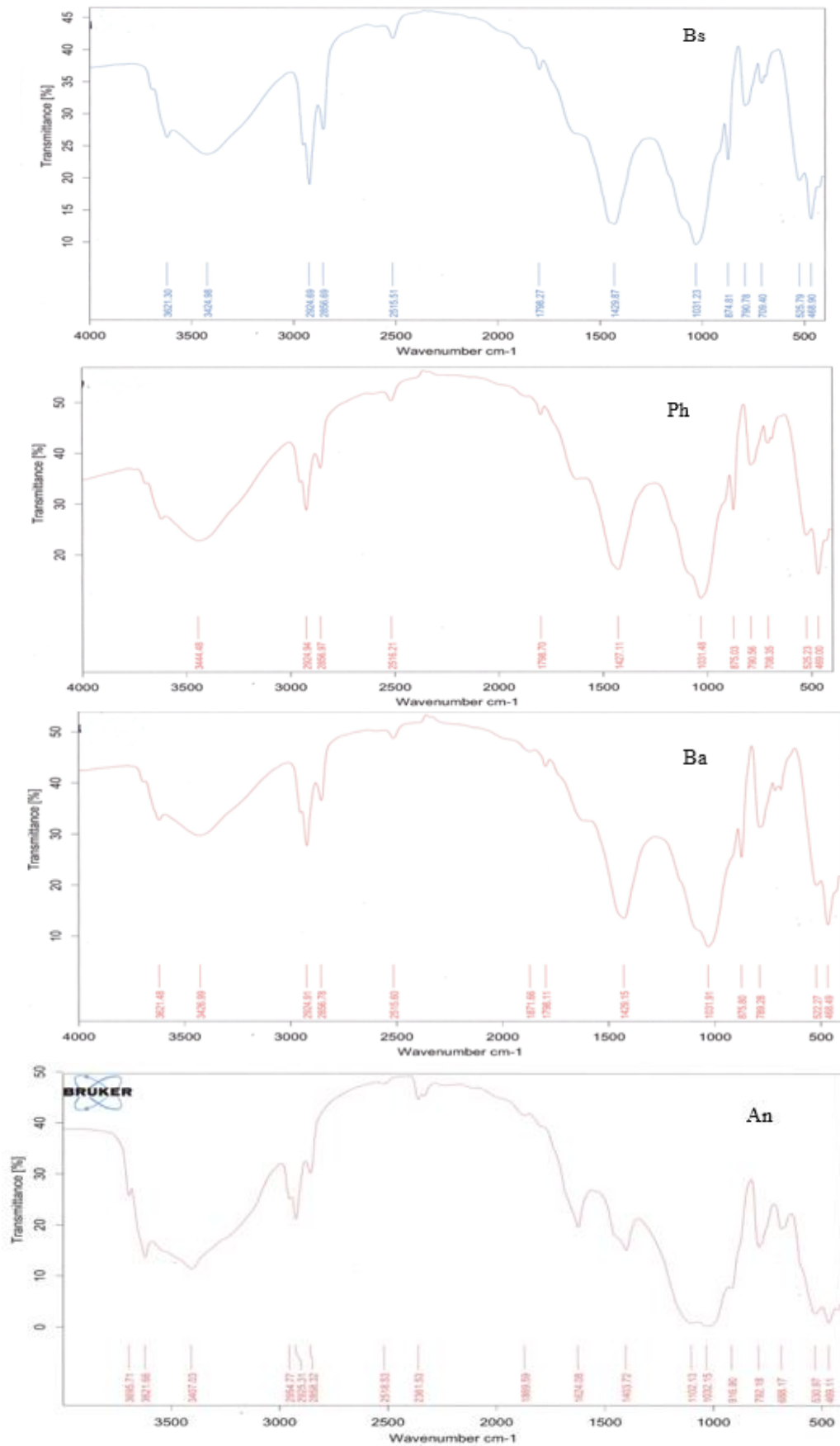


Fig. 44. Spectres IR des sols traités par atténuation naturelle (An), bioaugmentation (Ba), phytoremédiation (Ph) et biostimulation (Bs).

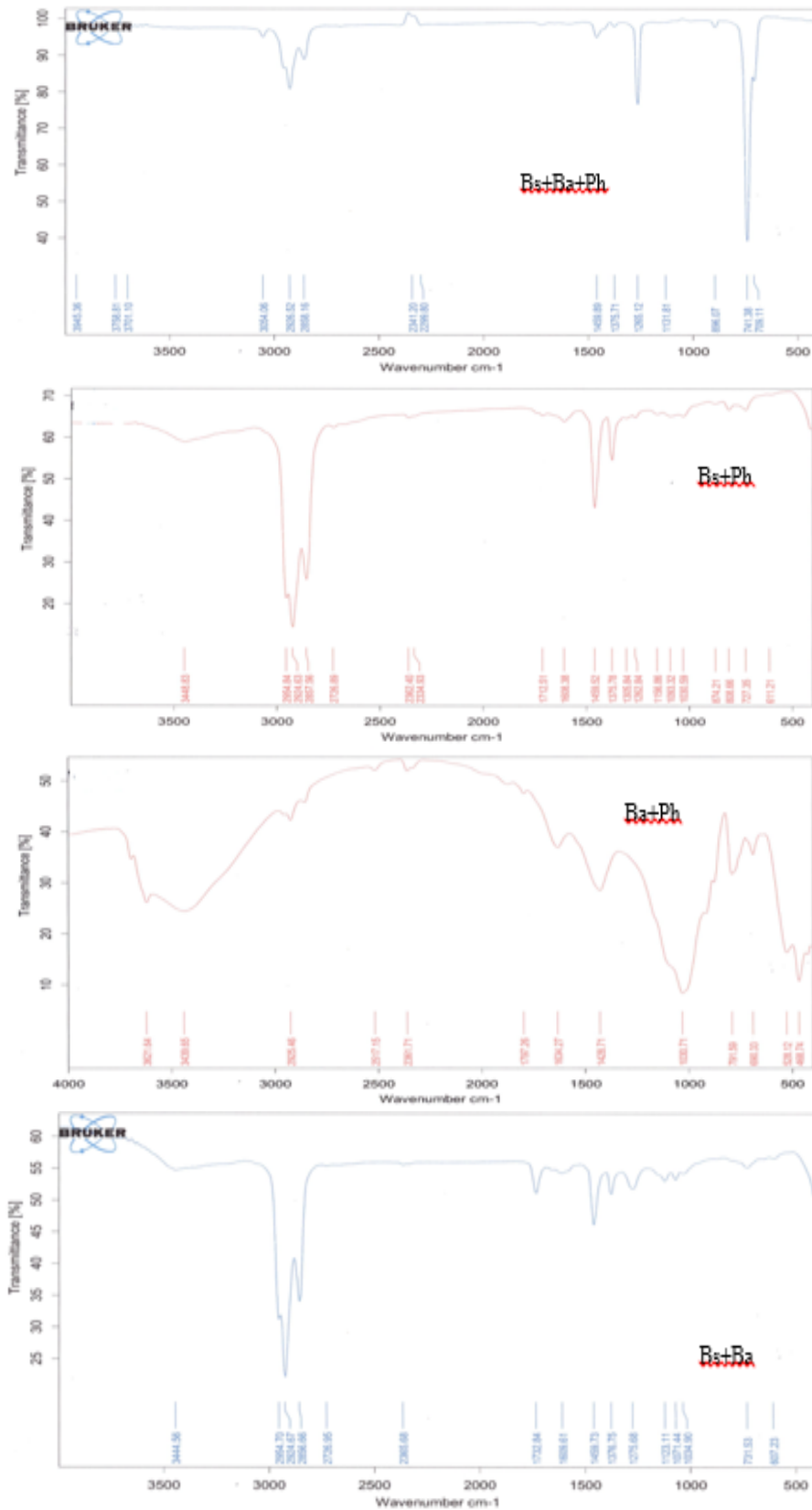


Fig. 45. Spectres IR des sols traités par les combinaisons biostimulation-bioaugmentation, biostimulation (Bs+Ba+Ph), biostimulation-bioaugmentation (Bs+Ba), biostimulation-phytoremédiation (Bs+Ph), et bioaugmentation-phytoremédiation (Ba+Ph)

Le taux de germination des graines de maïs le plus élevé a été obtenu dans le sol ayant été traité avec l'association des trois techniques traduisant la diminution de la toxicité dans le sol suite à la dégradation des hydrocarbures indiquée par la diminution de l'intensité des pics des spectres IR par rapport à ceux du sol pollué.

Le plus faible taux de germination des graines de maïs correspond à l'application de l'atténuation naturelle.

Plusieurs auteurs ont rapporté que l'atténuation naturelle avait une moindre efficacité que les techniques de bioremédiation. En effet, Beškoski et al. (2011) ont noté que la biostimulation et la bioaugmentation ont abouti à des taux de dégradation plus élevés que celui obtenu avec l'atténuation naturelle. Ces deux techniques ont engendré une augmentation considérable du nombre de dégradeurs en 7 semaines. Aussi, Bento et al. (2005) ont constaté que la biostimulation et la bioaugmentation ont éliminé 71% et 74% de la fraction légère du diesel contre 60% éliminés par l'atténuation naturelle au bout de 6 semaines. Selon Romaniuk et al. (2007), l'atténuation naturelle est plus lente et moins efficace que la biostimulation.

L'efficacité des combinaisons comparées entre elles, aux techniques appliquées seules et à l'atténuation naturelle est comme suit :

$$Bs+Ba+Ph > Bs+Ba > Bs+Ph = Ba+Ph > Bs = Ba > Ph > An$$

Il est à souligner que l'efficacité de la phytoremédiation est inférieure à celle de la bioaugmentation et de la biostimulation. Mais son association avec l'une des deux autres techniques ou avec les deux à la fois avait nettement amélioré son rendement en matière de décontamination du sol. Ceci pourrait être expliqué par un manque de nutriments dans le sol contaminé. En effet, Unterbrunner et al. (2007) ont corrélé la réduction de l'efficacité de la phytoremédiation avec un manque de nutriment, notamment le phosphore assimilable, dans le sol. Li et al. (2021b) ont observé une plus grande efficacité de dégradation des hydrocarbures dans le sol traité avec l'association biostimulation-phytoremédiation par rapport à ceux traités avec les techniques appliquées seules.

Par ailleurs, beaucoup de travaux ont montré l'efficacité de l'association plantes-bactéries dans la décontamination des sols pollués aux hydrocarbures (Kim et Sang, 2011 ; Khan et al., 2013 ; Xu et al., 2014 ; Agnello et al., 2016 ; Zuzolo et al., 2021). Dans ce genre d'association, les plantes secrètent des nutriments nécessaires à la croissance des bactéries et ces dernières réduisent le stress que subissent les plantes et qui est exercé par la présence des hydrocarbures, et ce en les dégradant ou en augmentant leur disponibilité. Cette association améliore donc la

croissance des plantes et vient corriger l'effet des hydrocarbures qui se traduit par un retard de croissance qui fait que ces plantes restent relativement petites (Chaineau et al., 1997 ; Xu et al., 2014). Il a été rapporté que la souche *P. aeruginosa* fait partie des bactéries qui améliorent la croissance des plantes (Odesemoye et Ugoji, 2009).

Il ressort aussi de nos résultats l'efficacité de la combinaison biostimulation-bioaugmentation dans la décontamination du sol. Ceci concorde avec les résultats de Lin et al. (2010) qui ont observé une élimination de 70 et 63% de diesel et de pétrole brut respectivement par l'association de la biostimulation et de la bioaugmentation durant une période relativement courte. Ces auteurs ont constaté également que la population microbienne avait augmenté de 10 fois dans ce sol par l'application conjointe de ces deux techniques. Nos résultats concordent aussi avec ceux de Simarro et al. (2013), de Fan et al. (2014), de Nadhirawaty et Sulistiyaning Titah (2019) et de Giovanella et al. (2021) qui ont prouvé l'efficacité de la combinaison de la biostimulation et de la bioaugmentation dans la décontamination des sols pollués par les hydrocarbures.

Dans cette association, les fertilisants favorisent la prolifération des microorganismes injectés dans le sol. Ainsi, en proliférant, les microorganismes vont dégrader les hydrocarbures surtout s'il s'agit de souches produisant des tensioactifs qui solubilisent les hydrocarbures adsorbés les rendant ainsi biodisponibles. En effet, la sorption des hydrocarbures est l'un des facteurs limitant leur biodégradation dans le sol même amendé (Mendez-Vega et al., 2007).

6. Production de biocarburants

Dans cette section, les plantes cultivées sur le sol contaminé et qui peuvent être utilisées dans la phytoremédiation sont utilisées pour produire des biocarburants afin de les valoriser. Ces plantes sont analysées au préalable pour détecter une éventuelle absorption d'hydrocarbures.

6.1. Résultats de la caractérisation des hydrocarbures dans les plantes

L'analyse par FTIR des plants de pois et de fève a montré qu'il y avait un passage dans les plantes des hydrocarbures présents dans le sol (Fig. 46).

Sur les spectres IR, l'intensité des pics correspondant notamment aux groupements fonctionnels des hydrocarbures (entre 2850 et 2970 cm^{-1} et entre 1340 et 1470 cm^{-1} correspondant aux alcanes, entre 1645 et 1670 cm^{-1} et entre 900 et 950 cm^{-1} correspondant aux alcènes, entre 690 et 900 cm^{-1} pour les aromatiques) est plus grande pour les deux espèces lorsqu'elles étaient

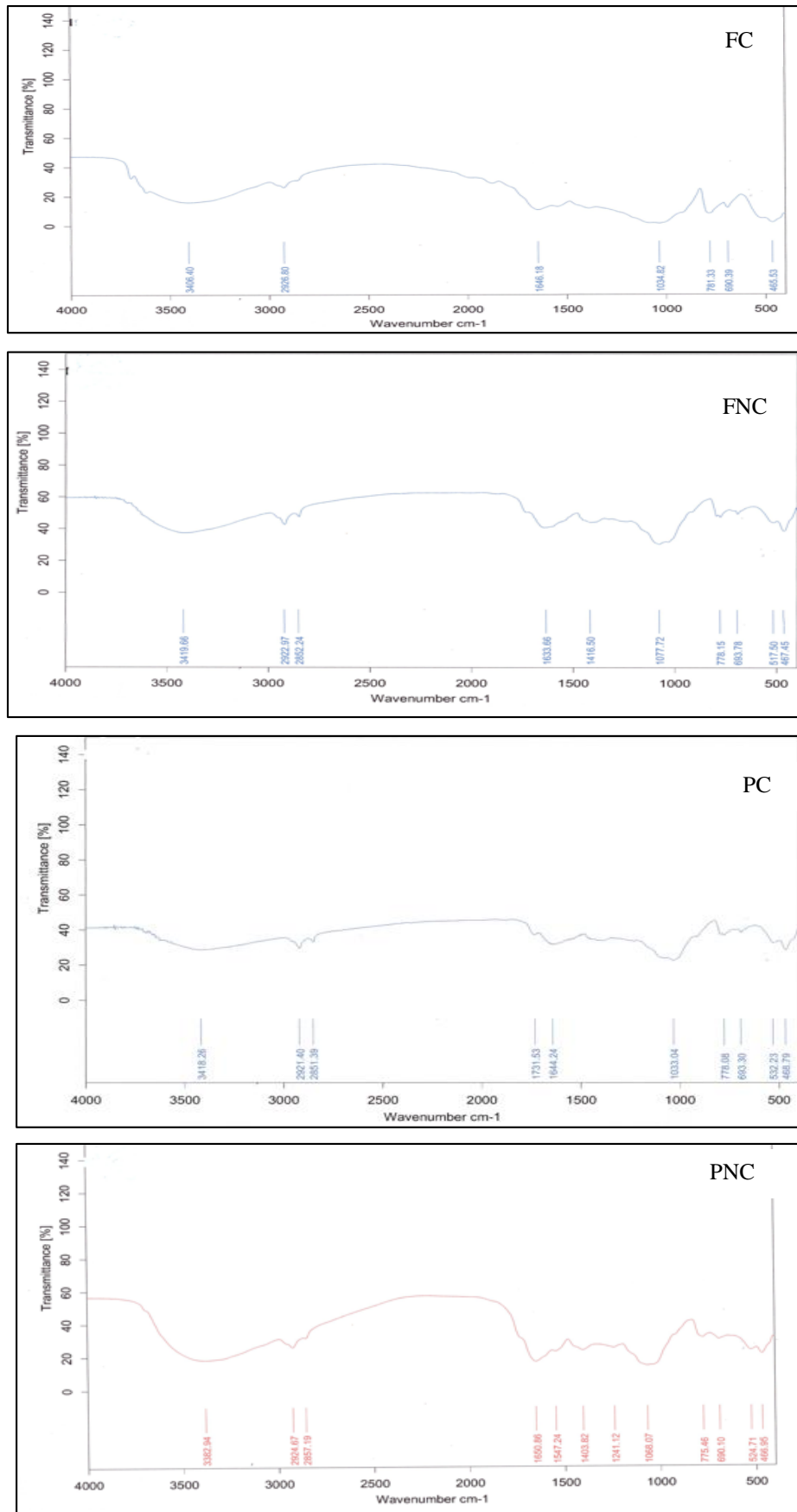


Fig. 46. Spectre IR des plants de fève (F) et de pois (P) cultivés sur sol non contaminé (NC) et sur sol contaminé (C)

cultivées sur le sol pollué par rapport à la culture sur le sol non pollué. Ceci montre qu'aussi bien la fève que le pois ont absorbé les hydrocarbures à partir du sol.

6.2. Résultats de la production des biocarburants

L'éthylotest a révélé la présence d'alcool dans les produits de distillation de la biomasse végétale. La quantité de bioéthanol produite par le pois et par la fève était respectivement d'environ 27 et 42ml pour des biomasses respectives de 8,4 et 12,4g. Le rapport du volume de bioéthanol produit sur la biomasse végétale représente une valeur énergétique de 1,7 et 1,8TEP/T pour le pois et la fève respectivement. Le rapport du World Energy Council indique qu'une tonne de biomasse végétale produit 13,5 TEP.

6.3. Discussion

Les parties récoltées des plants de fève et de pois utilisées dans les essais de laboratoires ont absorbé des hydrocarbures à partir du sol. Elles ne peuvent donc pas être restituées au sol, car elles restitueraient alors les hydrocarbures qu'elles ont extrait, ni être incinérées car elles libèreraient des polluants dans l'atmosphère. Elles doivent donc être éliminées ou valorisées par d'autres procédés. Khan et al. (2013) préconisent l'utilisation des plantes utilisées dans la phytoremédiation des sols pollués aux hydrocarbures dans la production de biocarburants. Des études récentes ont montré l'aptitude de microorganismes à produire du bioéthanol par fermentation (Shabih et al., 2018 ; Chintagunta et al., 2021) ou du biodiesel (Uthandi et al., 2021) à partir de la biomasse végétale.

La biomasse obtenue par la culture de la fève est supérieure à celle du pois, car la fève est une plante qui peut atteindre 120cm de haut alors que les plants du pois poussent jusqu'à 80cm. Le système racinaire de la fève présente plus de ramifications (Chaux et Foury, 1994 ; Clement, 1994).

Le rendement énergétique de la biomasse de la fève est légèrement plus élevé que celui du pois. La comparaison des deux valeurs énergétiques obtenues à la valeur de 13,5 TEP/T montre que la quantité de bioéthanol produite par la biomasse ligno-cellulosique des deux espèces végétales reste faible. La voie biochimique utilisant l'hydrolyse acide n'a donc pas donné le résultat escompté.

D'autres voies peuvent être utilisées pour améliorer l'efficacité de la production de bioéthanol. Selon Ballerini (2006), quelle que soit la voie de production de bioéthanol, biochimique ou

thermochimique, la nature de la biomasse mobilisée a une influence cruciale sur l'efficacité du procédé.

Les légumineuses contiennent dans leur biomasse jusqu'à 45% de cellulose, jusqu'à 32% d'hémicellulose et 13 à 23% de lignine au stade végétatif (Alane, 2007). Les fèves renferment 35,5% de cellulose, 15,5% d'hémicellulose et 15,5% de lignine, qui est une proportion assez importante (Bouajila et al., 2014). Dans les procédés biochimiques, la lignine est un co-produit qui n'est pas transformé en éthanol et donc sa présence diminue l'efficacité de conversion.

Le procédé enzymatique peut être utilisé dans l'hydrolyse de la biomasse (Roy, 2021). Il donne de meilleurs rendements que l'hydrolyse acide. Les deux procédés visent à rendre la cellulose accessible pour qu'elle soit transformée en biocarburant (Kumar et al., 2009). Le procédé enzymatique est confronté au prix des enzymes car elles sont très chères. Selon les chercheurs du Conseil mondial de l'énergie, la transformation thermochimique qui conduit à la gazéification des substances organiques et végétales, est particulièrement adaptée à la valorisation des produits ligno-cellulosiques. Dans ces procédés la lignine n'a pas d'importance puisque toute la plante est gazéifiée (Depatre, 2010). Mais ce procédé est risqué en raison des conditions sévères d'applications (température et pression élevées) qui rendent difficile son application à grande échelle. Son coût est également très élevé puisqu'il utilise un équipement à forte pression (An Tran et al., 2019).

Par ailleurs, des améliorations ont été obtenues dans le processus biochimique en utilisant des souches bactériennes, telles que *E. coli*, qui peuvent utiliser des pentoses que *S. cerevisiae* n'est pas capable de métaboliser. Un mélange de levures et de souches bactériennes peut conduire à une plus grande efficacité. Des souches de *S. cerevisiae* génétiquement modifiées pour avoir la capacité de métaboliser les pentoses peuvent être utilisés (Ballerini, 2006).

La lignine peut être utilisée pour produire un biogaz afin de valoriser toutes les fractions de la biomasse ligno-cellulosique. Celle-ci comprend généralement 20 à 50% de cellulose, 20 à 35% d'hémicellulose et 10 à 35% de lignine (Kumar et al., 2009).

Conclusion générale

Ce travail a été entrepris afin d'optimiser les paramètres des techniques biologiques de décontamination des sols pollués aux hydrocarbures.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que les solutions optimales calculées par les AGs permettent une utilisation rationnelle des matières. Elles ont permis, entre autres, de montrer que les fertilisants inorganiques pouvaient être utilisés avec des quantités plus faibles que celles préconisées par les travaux antérieurs. Elles ont démontré, également, que des doses de semis plus élevées que celles indiquées dans la littérature assuraient une plus grande efficacité.

Le sol contaminé a été caractérisé afin de définir son état avant l'application des traitements, en le comparant à un sol non contaminé. La pollution aux carburants a affecté la teneur du sol en matière organique, l'humidité, la densité et le rapport C/N qui étaient plus élevés dans le sol pollué. La biomasse microbienne, l'activité biologique et la perméabilité ont été réduites par la présence des carburants. Il en est de même pour le taux de germination des graines, qui a été réduit de près de 80 %.

Le choix de l'espèce végétale à utiliser dans la phytoremédiation a été fait suite à des essais de culture de quatre espèces de Fabacées et de quatre espèces de Poacées. Dans les essais hors site, les Fabacées testées (fève, pois, trèfle et luzerne) se sont révélées comme des espèces tolérantes vis-à-vis de la pollution du sol aux carburants. La fève a donné des résultats particulièrement intéressants car sa croissance a été la moins inhibée par la pollution. En revanche, les Poacées ont montré une plus grande sensibilité à cette pollution. Dans les essais sur site, les résultats obtenus pour la croissance de la fève ont été similaires à ceux obtenus dans l'expérience de laboratoire. La luzerne, quant à elle, n'a même pas levé sur le site.

Le choix de la souche bactérienne à utiliser dans la bioaugmentation s'est basé sur l'aptitude à produire des tensioactifs car cela leur donne un avantage par rapport aux autres souches dans la dégradation des hydrocarbures. Les résultats de la tension de surface et de l'indice d'émulsification, ont montré que les souches *P. aeruginosa* et *P. putida* ont produit des tensioactifs puissants capables de former des émulsions stables. Les autres souches testées, à savoir *C. fascians*, *B. subtilis* et *Micrococcus sp.* ont, elles aussi, produit des tensioactifs mais les résultats de la tension superficielle ont montré qu'ils étaient moins puissants que ceux

produits par les souches de *Pseudomonas*. Ces dernières ont aussi donné les meilleurs rendements en termes de production de tensioactifs.

L'optimisation mathématique par algorithmes génétiques a permis de déterminer les concentrations optimales de fertilisants, les densités optimales de la suspension de *P. aeruginosa*, les doses optimales de semis de la fève et les durées optimales de traitement. Les meilleurs individus sont regroupés dans la même classe et c'est celle-ci qui contient la meilleure solution.

L'optimisation des techniques de décontamination a montré que :

- ✓ les concentrations de fertilisants et la durée de traitement pouvaient être revues à la baisse, présentant, ainsi, une économie de substances et de temps et évitant les risques de pollution qui peuvent en découler.
- ✓ La densité et la durée les plus élevées étaient les plus adéquates car la souche utilisée est allochtone nécessitant un temps d'adaptation aux conditions du milieu.
- ✓ Les densités de semis préconisées pour la fève pouvaient être augmentées pour pallier la baisse de la densité des plants et de la biomasse occasionnée par la présence des carburants, assurant ainsi une meilleure efficacité.

Après l'application de l'une des solutions optimales de chaque modèle en laboratoire et sur site, les résultats obtenus par le test de germination des graines, la biomasse et respiration microbiennes concordaient avec ceux obtenus par l'optimisation.

L'essai menée, par la suite sur site, a permis de comparer l'efficacité des techniques appliquées seules ou en association les unes avec les autres. Les résultats de cet essai ont montré que les combinaisons avaient une meilleure efficacité, notamment la combinaison des trois techniques. L'efficacité des traitements appliqués in situ suit l'ordre :

$$Bs+Ba+Ph > Bs+Ba > Bs+Ph = Ba+Ph > Bs = Ba > Ph > An$$

L'atténuation naturelle a montré une efficacité moindre que tous les autres traitements, seuls ou combinés, soulignant ainsi l'apport de ces traitements.

Aussi, l'analyse IR des sols traités a montré que les hydrocarbures ont été dégradés en grande partie dans les sols traités, ce qui est conforme aux résultats du test de germination. Ceci démontre la pertinence de ce test comme indicateur de l'évolution de la toxicité dans le sol.

Enfin, l'analyse des plantes par IR a montré que les plants de fève et de pois ont absorbé les hydrocarbures par rapport à ceux cultivés sur sol non contaminé. Pour valoriser cette biomasse

végétale, elle a été utilisée pour produire un biocarburant de deuxième génération. L'éthylotest a mis en évidence la production de bioéthanol par la voie biochimique qui repose sur la fermentation de la biomasse ligno-cellulosique en éthanol par la levure de boulanger *S. cerevisiae*, même si la quantité produite n'est pas élevée.

Au terme de ce travail, il serait intéressant de proposer quelques perspectives pour les recherches futures telles que :

- La réalisation d'essais multi-locaux dans diverses conditions pour étudier la conformité des résultats obtenus par l'optimisation ;
- L'utilisation d'autres organismes vivants du sol comme les vers de terre, les gastéropodes et les collemboles dans les bio-essais pour évaluer l'évolution de la toxicité dans le sol comme complément au test de germination des graines ;
- La quantification de paramètres physiologiques comme la teneur des plantes en chlorophylle, en sucres solubles, en proline et en polyphénols afin de rendre compte des effets de la pollution sur le plan métabolique et de comprendre les mécanismes de réponse des plantes au stress polluant ;
- L'identification des genres bactériens présents dans le sol pollué afin d'utiliser les souches autochtones qui sont déjà adaptées au sol, et en consortium pour une plus grande efficacité de la bioaugmentation ;
- Comparer la méthode d'optimisation par les AGs avec d'autres méthodes pour confirmer les résultats obtenus dans ce travail ;
- Pour valoriser les plantes en les utilisant dans la production de biocarburants, il serait intéressant d'appliquer la liquéfaction de la biomasse ligno-cellulosique pour obtenir un bio-crude au lieu de la voie biochimique dont le rendement énergétique n'a pas été élevé ;
- Tester l'efficacité des plantes ornementales pérennes à feuillage persistant dans la décontamination des sites pollués des stations-services pour remplacer la fève qui est une espèce alimentaire annuelle. Ces plantes, en plus de dépolluer le sol, vont enjoliver le paysage.

Références bibliographiques

Abdul-Ameer Ali W. 2019. Biodegradation and phytotoxicity of crude oil hydrocarbons in an agricultural soil. *Chil. j. agric. res.* 79(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392019000200266>

Abid A. Zaafour K. Aydi A. Manai I. Ben Hassen Trabesli A. Messaoud C. and Hamdi M. 2014. Feasibility of a Bioremediation Process Using Biostimulation with Inorganic nutrient NPK for Hydrocarbon Contaminated Soil in Tunisia. *J. Biorem. Biodeg.* 5 (4) : 1-6

Abu Ruwaida A.S., Banat I.M. Haditirto S., Salem A., Kadri M. 1991. Isolation of biosurfactant-producing bacteria. Product characterization and evaluation. *Acta Biotechnologica.* 11(4) : 49-57.

Adams G.O., Fufeyin P.T., Okoro S.E., Ehinomen I. 2015. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation : A review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation.* 3(1) : 28-39.

ADEME. 2009. Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie. France. <http://www.ademe.fr>.

Agnello A.C., Bagard M., E.D. Van Hullebusch E.D., Esposito G., Huguenot D. 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of The Total Environment.* 564 : 693-703.

Alane F., 2007 : valeur nutritive des légumineuses fourragères : cas des luzernes (genre *Medicago*). Mémoire magister. ENSA. 96 p.

Al-Mailem D.M., Al-Deieg M., Elias M., Radwan S. 2017. Biostimulation des microorganismes indigènes pour la bioremédiation des microcosmes hypersaliens huileux du golfe arabe. Les régions koweïtiennes. *Journal of Environmental Management.* 193 : 576-583.

Alrumman S.A., Standing D.B., Patonb G.I. 2015. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University-Science.* 27(1) : 31-41.

An Tran T.T., Phung Le T.K., Mai T.P., Nguyen D.Q. 2021. Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass. Review. *Current Technologies and Future Prospect.* doi : [10.5772/intechopen.86437](https://doi.org/10.5772/intechopen.86437)

Anabelle C. 2012. Evaluation des impacts de l'utilisation de biocarburants de seconde génération sur les usages de sols : analyse en équilibres générales calculable : le cas de *Miscanthus* en union européenne. Mémoire de Magister en sciences agronomiques. 58p.

Arnold S., Henkel M., Wanger J., Wittgens A., Rosenau F., Hausmann R. 2019. Heterogenous rhamnolipid biosynthesis by *P. putida* KT2440 on bio-oil derived small organic acids and fractions. *AMB Express.* 9, 80. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0804-7>

Atagana H.I. 2011. Bioremediation of Co-contamination of Crude Oil and Heavy Metals in Soil by Phytoremediation Using *Chromolaena odorata* (L) King & H.E. Robinson. *Water air soil pollut.* 215(4) : 261-271.

- Bäck T. 1997.** Evolutionary computation : comments on the history and current state. IEEE Trans. Evol. Comput. 1 : 3-17.
- Bahmani F., Ataei S.A., Mikaili-Kherameh M.A. 2018.** The Effect of Moisture Content Variation on the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soils : Modeling and Experimental Investigation. J. Environ. Anal. Chem. 5(2) : 2380-2391.
- Baize D., Jabirot B. 2011.** Guide pour la description des sols. 1^{ère} Edition. Quae. 430p.
- Ballerini D. 2006 :** Les biocarburants : état des lieux, perspectives et enjeux de développement, Institut Français du Pétrole. 235p.
- Ballerini D., Vandecasteele J.P. 1999.** La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. Biotechnologie. Coordinateur Scriban R. 5^{ème} édition. Tech et Doc. 835-865.
- Banat I.M. 1995.** Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation : a review. Bioresource Technology. 51 : 1-12.
- Basol. 2006.** <http://www.basol.developpement-durable.gouv.fr>
- Bayer D.M., Chagas-Spinelli A.C.O., Gavazza S., Kato M.T. 2013.** Natural Attenuation and Biosurfactant-Stimulated Bioremediation of Estuarine Sediments Contaminated with Diesel Oil. Appl. biochem. biotechnol. 171(1) : 173-188.
- Bellout Y., Khelif L., Guivarch A., Haouche L., Djebbar R., Carol P., Abrous Belbachir O. 2016.** Impact of edaphic hydrocarbon pollution on the morphology and physiology of pea roots (*Pisum sativum* L.). Applied Ecology and Environmental Research 14(2) : 511-525.
- Bento, F. M. Camargo, F. A. O. Okeke, B. C. and Frankenberger, W. T. 2005.** Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology. 96: 1049–1055
- Bergue J., Mérienne D. 1986.** La pollution des sols par les hydrocarbures. Bull Liaison Lab. Ponts Chauss. 146 : 57-66.
- Bertrand M. 2018.** La protection des sols dans le cadre de l'union européenne. Thèse Doctorat. Université Jean Moulin de Lyon. 672p.
- Beškoski V.P., Gojgić -Cvijović G., Milić J., Ilić M. Miletić S., Šolević T., Vrvic M.M. 2011.** Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – A field experiment. Chemosphere 83 : 34-40.
- Bessi H., El Alami M. 2009.** Les bioessais dans l'évaluation d'impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. Les technologies de laboratoire. 4(15) : 16-22.
- Bliefert C., Perraud R. 2001.** Chimie de l'environnement (Air, Eau, Sol, Déchet). 1^{ère} Edition. De Boeck. 477p.
- Bosco F., Casale A., Mazzarino I., Godio A., Ruffino B., Mollea C., Chiampo, F. 2019.** Microcosm evaluation of bioaugmentation and biostimulation efficacy on diesel contaminated soil. J. Chemical Technology and Biotechnology. <https://doi.org/10.1002/jctb.5966>

- Bouajila K., Ben Jeddi F., Taamallah H., Jedidi N., Sanaa M. 2014.** Effets de la composition chimique et biochimique des résidus de cultures sur leur décomposition dans un sol Limono-Argileux du semi-aride (Chemical and biochemical composition's Effect of crop residues on their decomposition in semi-arid). *J. Mater. Environ. Sci.* 5(1) : 159-166.
- Braddock J.F., Ruth M.L., Catterall P.H. 1997.** Enhancement and Inhibition of Microbial Activity in Hydrocarbon-Contaminated Arctic Soils : Implications for Nutrient-Amended Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 31 (7) : 2078–2084
- Brzecz J., Kapusta P., Steliga T., Turkiewicz A. 2020.** Hydrocarbon Removal by Two Differently Developed Microbial Inoculants and Comparing Their Actions with Biostimulation Treatment. *Molecules.* 25(661) : 1-23
- Cadiere F. 2006.** Traitement biologique des sols pollués : recherche et innovation. Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par l'ADIT- société nationale d'intelligence stratégique. Département sites et sols pollués. Direction déchets et sols- ADEME (Angers). 92p.
- Calvet R. 2003.** Le sol, propriétés et fonction, constitution et structure : phénomènes aux interfaces. France agricole. 455p.
- Calvet R. 2005.** Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales. France agricole. 637p.
- Cerf R. 1996.** A New Genetic Algorithm. *The Annals of Applied Probability.* 6(3) : 778-817.
- Cerniglia C. 1992.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3 : 351-368.
- Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J. 1996.** Land treatment of oil-based drill cutting in an agricultural soil. *Journal of Environment Quality.* 25 : 858-867.
- Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J., 1997.** Phytotoxicity and plant uptake of Fuel Oil hydrocarbons. *J. Environ. Quali.* 26 : 1478-1483.
- Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J. 2000.** Biodegradation of the fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *Journal of environmental quality.* 29 : 569-578.
- Chaux C., Foury C. 1994.** Productions légumières. Tome 3. Légumineuses potagères. Tec et Doc. 295p.
- Chevrier E. 2013.** La phytoremédiation, une solution d'avenir pour le Québec. Mémoire en vue de l'obtention du grade de maître de l'environnement. Université de Sherbrooke. 102p.
- Chintagunta A.D., Zuccaro G., Kumar M., Jeevan Kumar S.P., Garlapati V.K., Postemsky P.D., Sampath kumar M.S., Chandel A.K., Simal-Gandara J. 2021.** Biodiesel Production From Lignocellulosic Biomass Using Oleaginous Microbes : Prospects for Integrated Biofuel Production. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicatab.2021.658284>
- Chitour C. 1983.** Le raffinage du pétrole. T1. OPU. 93p.
- Chocat B. 2004.** Pollution par les hydrocarbures dans les eaux de ruissellement et traitabilité : Solution existante, 1^{ère} édition. Tec et Doc. 290p.

- Chopra A., Bobate S., Rahi P., Banpurkar A., Mazumder P.B., Satpute S. 2020.** *Pseudomonas aeruginosa* RTE4: A tea rhizobacterium with potential for plant growth promotion and biosurfactant production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00861>
- Christelle R. 2007.** Etude des algorithmes génétiques et application aux données de protéomique. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier I. 179p.
- Claxton L.D. 2015.** The history, genotoxicity and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions: Part 4 – Alternative fuels. A review. *Mutation Research* 763 : 86 -102.
- Clement J.M. 1994.** Le technicien d'agriculture tropicale – Les cultures maraichères. Librairie Larousse. 191p.
- Colin F. 2000.** Pollution localisée des sols et sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés. *Tec et Doc.* 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-Bénéfices. Rapport final BRGM/RP-58609-FR. 399p.
- Cormier G. 2005.** L'algorithme génétique en génie-électrique : application à l'ellipsométrie et aux réseaux de BRAGG. *Engineering, Electronics and electrical, Applied Mechanics.* eLibrary. ID : 9381205.
- Coulon F., Dellile D. 2003.** Effets des traitements de biostimulation sur la croissance des bactéries indigènes d'un sol subantarctique contaminé par des hydrocarbures. *Oil & Gas Science and technology-Rev. IFP.* 58(4) : 469-479.
- Cunningham S.D., Berti W.R. 1993.** Remediation of contaminated soils with green plants : an overview. *In vitro cellular and developmental Biology-plant*, 29 (4) : 207-208.
- Da Silva I.A., Mendonça Resende A.H., Da Rocha-Silva N.M.P., Ferreira Brasileiro P.P., De Amorim J.D.P., De Luna J.M., Rufino R.D., Dos Santos V.A., Sarubbo L.A. 2018.** Application of Biosurfactants Produced by *Bacillus cereus* and *Candida sphaerica* in the Bioremediation of Petroleum Derivative in Soil and Water. *Chemical Engineering Transactions.* 64 : 1-6.
- Dabouineau L., Lamy Y., Collas P. 2005.** Phytoremédiation et phytorestauration ou l'utilisation des plantes pour la dépollution et l'épuration des eaux usées. *Le Rôle d'eau.* 124 : 8-15.
- Davis J.W., Madsen S. 1996.** Factor affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere.* 33 : 107-130.
- Debiton C. 2011.** Identification des caractères des grains de blé (*Triticum aestivum* L.) favorable à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble des cultures et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy. Thèse de Doctorat en physiologie et génétique moléculaire. Université de plaise Pascal. 274p.

- Del Panno M.T., Morelli I.S., Engelen B., Berthe-Corti L. 2005.** Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology*. 53(2) : 305-316.
- Delage P., Schrefler B. 2005.** Géomécanique environnementale : sols pollués et déchets. Lavoisier. 248p.
- Denisova E., Kubareva M., Bokarev A., Utuganova V. Kovalkovskay N. 2019.** Phytotoxicity of gaseous limit and aromatic hydrocarbons in relation to some agricultural plants. *Agritech IOP Conf. Series : Earth and Environmental Science* 315. [doi:10.1088/1755-1315/315/5/052013](https://doi.org/10.1088/1755-1315/315/5/052013) 1
- Departe A. 2010.** Etude prospective sur la seconde génération de biocarburants. Ministère de l'économie et des finances. Trésor - Direction générale. 51p.
<http://www.tresor.economie.gouv.fr/file/326047>
- Dommergues Y. 1973.** Principes de méthodologie en microbiologie du sol. Nouveaux documents pour une étude intégrée en écologie du sol. CNRS. 13-30.
- Dommergues Y., Mangenot F. 1970.** Ecologie microbienne du sol. Edition Masson. 796p.
- Duchaufour P. 1991.** Abrégé de pédologie : sol, végétation et environnement. Masson. 334p.
- Duchaufour P. 2001.** Introduction à la science du sol : sol, végétation et environnement. 6^{ème} édition. DUNOD. 331p.
- El-Sheshtawy H.S., Doheim M.M. 2014.** Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian journal of petroleum*. 23(1) : 1-6.
- Fan M.Y., Xie R.J. Gang Q. 2014.** Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with yeast. *Environ. technol.* 35(4) : 391-399.
- Fattal P. 2008.** Pollution des cotes par les hydrocarbures. Presse universitaire de Renne. 395p.
- Feng L.J., Zhang L.Q., Feng L., Li Li J. 2019.** Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil amended with sewage sludge and skudge compost. *Environmental Science and Pollution Research*. 26 : 34127-34136.
- Gabet S. 2004.** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de Doctrat. Université de Limoges. 177p.
- Garric J. 2009.** L'écotoxicologie : entre recherche et application, quelques notions introductives. 5^{ème} journée thématique de la ZABR : La démarche écotoxicologique pour la protection et l'évaluation de la qualité des milieux. 24 septembre 2009.
- Gaudu F. 2014.** Bioremédiation des sols pollués aux hydrocarbures. Biologie gestion marketing. Université de Rennes. 26p.

- Ghaheri A., Shoar S., Naderan M., Shahabuddin S. 2015.** The Applications of Genetic Algorithms in Medicine. *Oman Medical Journal*. 30(6) : 406-416.
- Ghaly A.E., Yusran A., Dave D. 2013.** Effects of Biostimulation and Bioaugmentation on The Degradation of Pyrene in Soil. *J. Bioremed. Biodeg.* S7:005. [Doi:10.4172/2155-6199.S7-005](https://doi.org/10.4172/2155-6199.S7-005).
- Ghosh I., Jasmine J., Mukherji S. 2014.** Biodegradation of pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain RS1 isolated from refinery sludge. *Bioresource Technology*. 166 : 548-558.
- Giddens J. 1976.** Spent motor oil effects on soil and crops. *J. Environ. Qual.* 5(2) : 179-181.
- Giovanella P., De Azevedo Duarte L., Kita D.M., De Oliveira V.M., Durães Sette L. 2021.** Effect of biostimulation and bioaugmentation on hydrocarbon degradation and detoxification of diesel-contaminated soil : a microcosm study. *Journal of Microbiology*. 59 : 634-643.
- Girard M.C., Walter C., Remy J.C., Berthelin J., Morel J.I. 2005.** Sol et environnement. DUNOD. 816p.
- Good A.G., Beatty P.H. 2011.** Fertilizing Nature : A Tragedy of Excess in the Commons. *PLoS Biology*. 9(88) : 1-9
- Grammont V. 2006.** Les biocarburants à partir de ressources ligno-cellulosiques : présentation des filières et identification des risques. Laboratoire d'évaluation des matières dangereuses. INERIS. 30 p.
- Guenounou O. 2009.** Méthodologie de conception de contrôleurs intelligents par l'approche génétique- application à un bioprocédé. Thèse de Doctorat. Spécialité Systèmes automatiques. Université de Toulouse III- Paul Sabatier. 144p.
- Haider F.U., Ejazc A.M., Alam S., Muhammad C., Khane I., Zhaoc B., Liquanab C., Salim M.A. Naveede M., Khanf N., Núñez-Delgado A. Mustafah M. 2021.** Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons : Sources, impacts and remediation strategies. *Environmental Research*. 197. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111031>
- Heller R., Esnault R., Lance C. 1998.** Physiologie végétale. Nutrition. 6^{ème} édition. DUNOD. 323 p.
- Henner P., Schiavon M., Druelle V., Lichtfouse E. 1999.** Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Organic Geochemistry*. 30, 963-969.
- Hsueh Y.H., Somers E.B., Lereclus D., Ghelardi E., Lee Wong A.C. 2020.** Biosurfactant Production and Surface Translocation Are Regulated by PlcR in *Bacillus cereus* ATCC 14579 under Low-Nutrient Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(22) DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00690-07>
- Huang L. Mab T. Li D. Liang F. Liu R. L., Li G. 2008.** Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin*. 56 : 1714-1718.

- Hunsaker C.T., Graham R.L., Suter G.W., O'Neill R.V., Barnthouse L.W., Gardner R.H. 1990.** Assessing Ecological Risk on a Regional Scale. *Environmental Management*. 14(3) : 325-332.
- Janek T., Lukaszewicz M., Krasowska A. 2013.** Identification and characterization of biosurfactants produced by the arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*. 110 : 379-386.
- Jeannot R., Lemièrre B., Chiron S. 2000.** Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. BRGM/PR-50128-FR. 110p.
- Jenkinson D.S., Powlson D.S. 1976.** The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. 8(3) : 209-213.
- Jennings F.M., Tanner R.S. 2000.** Biosurfactant-producing bacteria found in contaminated and uncontaminated soils. *Proceedings of the 2000 conference on hazardous waste research* : 299-305.
- Kanna R., Gummadi S.N., Kumar G.S. 2014.** Production and characterization of biosurfactant by *Pseudomonas putida* MTCC2467. *Journal of Biological Sciences*. 14(6) : 436-445.
- Khajehnouri Y. 2011.** Propriétés électriques des sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers : Etude en laboratoire. Mémoire Maitrise. Université de Montréal. 220p.
- Khamis N., Abdul Rahim A., Ibrahim N.A., Pahirul Zaman A.K. 2020.** Characterization of biosurfactant production by indigenous bacteria from Sungai Dungun estuary, Terengganu by surface activity and emulsification test. *International Conference on Science and Technology 2020. Series : Earth and Environmental Science*. [Doi:10.1088/1755-1315/596/1/012003](https://doi.org/10.1088/1755-1315/596/1/012003) 1
- Khan S., Afzal M., Iqbal I., Khan Q.M. 2013.** Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Review. Chemosphere* 90 : 1317-1332.
- Kim J.Y., Sang S.L. 2011.** In-situ Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons-Contaminated Soil by *Pseudomonas* Species. *Korean Society for Microbiology and Biotechnology*. 39(2) : 161-167.
- Koller E. 2004.** Traitement des pollutions industrielles : eau, air, déchets, boues. DUNOD. 299p.
- Koshlaf E., Shahsavari E., Haleyur N., Osborn A.M., Ball A.S. 2019.** Effect of biostimulation on the distribution and composition of the microbial community of a polycyclic aromatic hydrocarboncontaminated landfill soil during bioremediation. *Geoderma*. 338 : 216-225.
- Kumar A.G., Vijayakumar L., Gajendra Joshi G., Peter D.M., Dharani G., Kirubakaran R. 2014.** Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresource Technology* 170 : 556-564.
- Kumar S., Singh S., Mishra I., Adhikari D. 2009.** Recent Advances in Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. *Chemical Engineering & Technology*. 32(4): 517-526.

- Labud V., Garcia C., Hernandez T. 2007.** Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*. 66(10) : 1863-1871.
- Laurent F., Crepineau C., Rychien G., Feidet C., Le roux Y., Lichfouse E. 2005.** Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 : 4841-4845.
- Le Corfec Y. 2011.** Sites et sols pollués. DUNOD. 407p.
- Leahy J.G., Colwell R.R. 1990.** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54(3) : 305-315.
- Leardi R. 2003.** Nature-inspired Methods in Chemometrics : Genetic Algorithms and Artificial Neural Networks. Volume 23. Elsevier Science. 402p.
- Lebkowska M., Zborowska E., Karwowska E., Miaskiewicz-Peska E. 2011.** Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms : field-scale process in Poland. *Ecological engineering*. 37(11) : 1895-1900.
- Lecomte P. 1998.** Les sites pollués. Traitement des sols et des eaux souterraines. 2^{ème} édition. Tec et Doc. 204p.
- Lemarchand F. 2007.** Les biocarburants ne sont pas si vert, article dans le périodique la recherche n° 408. Société d'Éditions scientifiques : 54-57.
- Lemière B., Serguin J.J., Le guern C., Guyonnet D., Baranger P. 2001.** Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. BRGM/RP-50662-FR. 103p.
- Levasseur S. 2007.** Analyse inverse en géotechnique : Développement d'une méthode à base d'algorithmes génétiques. Thèse Doctorat. Université Joseph Fourier-Grenoble I. 240p.
- Li X., Chen Y., Du X., Zheng J., Lu D., Liu Z. 2021a.** Ecological Response in the Integrated Process of Biostimulation and Bioaugmentation of Diesel-Contaminated Soil. *Appl. Sci.* 11(14). 6305. <https://doi.org/10.3390/app11146305>
- Li J., Ma N., Hao B., Qin F., Zhang X. 2021b.** Biostimulation-phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil : Response surface methodology (RSM). *Research Square*. April 28th: 1-18. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-360082/v1>
- Lin T.C., Pan P.T., Cheng S.S. 2010.** Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 176 : 27-34.
- Liu R., Xiao N., Wei S., Zhao L., An J. 2014.** Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Science of the Total Environment* 473 : 350-358.
- Liu J.W., Duan X.D., Wu L.P., Masakorala K. 2018.** Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SNP0614 and its effect on biodegradation of petroleum. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 54 : 155-162.

- Liu J., Zhao S., Zhang R., Dai Y., Zhang C., Jia H., Guo X. 2021.** How important is abiotic dissipation in natural attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil ? Science of The Total Environment. 758, 143687. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143687>
- Lors C., Damidot D., Ponge J.F., Périé F. 2012.** Comparison of bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. Environmental Pollution. 165: 11-17
- Lu L., Liu Z., Li S., Bai M., Fan Z. 2021.** Volatilization Process of Toluene From Contaminated Soil Under Consideration of CoExistence of Pore Water. Environmental Science and Pollution Research : 1-17 <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15397-x>.
- Maes E., Schadeck S., Brahy V. 2007.** La contamination locale des sols. Chapitre [11]- Les sols et l'environnement terrestre. Rapport analytique. Ministère de la Région Wallone - Direction Générale des Ressources Naturelles et de l'Environnement, Wallonie. Pp : 500-519.
- Crone M. 2013.** Diagnostic de sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) à l'aide de la spectrophotométrie UV. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 166p.
- Mao J., Luo Y., Teng Y., Li Z. 2012.** Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. International Biodeterioration & Biodegradation 70 : 141-147.
- Marchal R., Penet S., Solano-Serena S.F., Vandecasteele J.P. 2003.** Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. Oil & Gas Science and Technology-Rev. IFR. 58(4) : 441-448.
- Margesin R., Schinner F. 2001.** Bioremediation (naturel attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Appl.enviro. Microbiol. 67 : 3127-3133.
- Martin B.C., George S.J., Price C.A., Ryan M.H., Tibbett M. 2014.** The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions : A Review. Science of the Total Environment 472 : 642-653.
- Martinez-Alvarez L.M., Balbo A.L., MacCormack W.P., Ruberto L.A.M. 2015.** Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils in cold regions : development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Arctica.Sci. Total Environ. 590 : 194-203.
- Martinez-Toledo A., Rodriguez-Vasquez R. 2013.** In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. Braz. J. Microbiol. 44(2). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200040>
- Mathieu C., Pieltain F. 1998.** Analyses physiques du sol-Méthodes choisies. Tec et Doc. 274p.
- Mathieu C., Pieltain F. 2003.** Analyses chimiques du sol-Méthodes choisies. Tec et Doc. 388p.
- Mattei G. 1995.** Dégradation des hydrocarbures d'origine pétrolière par voie microbiologique. Bioenergies 2 : 1-5.

- Matvyeyeva O.L., Vasylchenko O.A., Alivieva O.R. 2014.** Microbial Biosurfactants Role in Oil Products Biodegradation. International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation. 2(2) : 69-74.
- McCall J. 2005.** Genetic algorithms for modelling and optimization. J. of Computational and Applied Mathematics. 184 : 205-222
- Menendez-Vega D., Gallego J.L.R., Pelaez A.I., De Cordoba G.F., Moreno J., Munõz D., Sanchez J. 2007.** Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. European Journal of Soil Biology. 43 : 310-321.
- Mi Jin H., Choi E.J., Jeon C.O. 2013.** Isolation of a BTEX-degrading bacterium, *Jenibacter* sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. Bioresource Technology. 145 : 57-64.
- Morel R. 1996.** Les sols cultivés. 2^{ème} Edition. Lavoisier. 378 p.
- Morgan P., Watkinson R.J. 1989.** Microbiological methods for the clean-up of soil and ground water contaminated with halogenated hydrocarbons. Microbiology reviews. 63 : 277-300.
- Muck J.C. 2007.** Les carburants. <http://muck.jeanclaude.free.fr>
- Nadhirawaty R., Sulistiyaning Titah H. 2019.** Simultaneous Bioaugmentation and Biostimulation to Remediate Soil Contaminated by Ship Dismantling in Bangkalan District, Indonesia. J. Health Pollut. 2019 Dec ; 9(24) : 191212. doi: 10.5696/2156-9614-9.24.191212
- Nasseri S., Rezaei Kalantary R., Nourich N., Naddafi K., Mahvi A.H., Baradaran N. 2010.** Influence of bioaugmentation in biodegradation of pahs-contaminated soil in bio-slurry phase reactor. Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng. 7(3) : 199-208.
- Nicolardot B., Chaussod R., Catroux G. 1982.** Revue des principales méthodes disponibles pour mesurer la biomasse microbienne et ses activités. Science du sol. Bulletin de l'AFES. 4 : 253-261.
- Nisha P., Nayana M., Varghese V. 2013.** Degradation Studies on Diesel Oil using Bacterial Consortium Isolated from Oil polluted Soil. Biochemistry & Biotechnology. 5 : 683 556.
- Nithyameenakshi S., Jeyaramraja P.R., Manian S. 2006.** Investigations on phytotoxicity of two new fungicides, Azoxystrobin and Difenoconazole. American Journal of Plant Physiology. 1(1) : 89-98.
- Njuko K., Akinola O., Oboh B. O. 2009.** Phytoremediation of crude oil contaminated soil. The effect of growth of *Glycine max* on the physic-chemistry and crude oil contents of soil. Nature and Science. 7 : 79-87
- Noel C., Gourry J.C., Deparis J., Blessing M., Ignatiadis I., Guimbaud C. 2016.** Combining Geoelectrical Measurements and CO₂ Analyses to Monitor the Enhanced Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soils : A Field Implementation. Applied and Environmental Soil Science. ID 1480976. 15p. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1480976>

- Nowak C., Mossmann J.R., Saada A. 2003.** Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle : mécanismes et mise en œuvre. Rapport BRGM/RP-51960-FR. 97 p.
- Odesemoye A.O., Ugoji E.O. 2009.** Evaluating *Pseudomonas aeruginosa* as plant growth-promoting rhizobacteria in West Africa. Archives of Pathology and Plant Protection. 42(2) : 188-200.
- Origo N., Wicherek S., Hotyat M. 2012.** Réhabilitation des sites pollués par phytoremediation. Revue électronique en sciences de l'environnement. 12(2). <https://doi.org/10.4000/vertigo.12633>
- Ortega-Calvo J.J., Tejada-Agredano M.C., Jimenez-Sanchez C., Congiu E., Sungthong R., Niqui-Arroyo J.L., Cantos M. 2011.** Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation. J. Hazard. Mater. 261 : 733-745.
- Oudot J. 1975.** Contribution à l'étude de la dégradation bactérienne des hydrocarbures. Produits et facteurs susceptibles de modifier la cinétique du phénomène. Thèse Doctorat. Université de Dijon. 121 p.
- Peele Karlapudi A., Venkateswarulu T.C., Tamminedi J., Kanumuri L., Prabhakar Kodali V. 2018.** Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution : A review. Petroleum. 4(3) : 241-249.
- Pelaez A.I., Lores I., Sotres A., Mendez-Garcia C., Fernandez-Velarde C., Santos J.A., Gallego J.R., Sanchez J. 2013.** Design and field-scale implementation of an "on site" bioremediation treatment in PAH-polluted soil. Environmental Pollution. 181 : 190-199.
- Persson A., Molin G. 1987.** Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and Vibrionaceae growing on carbohydrates. Applied microbiology and Biotechnology. 26. (5) : 439-442.
- Picot A., Montandon F. 2013.** Ecotoxicochimie appliquée aux hydrocarbures. Tec et Doc. 668p.
- Piedrafita-Carnicer M.V. Carnicer M. 2013.** La pollution ponctuelle des sols. Editions universitaires européennes. 192p.
- Plaza G A., Lukasik K., Wypych J., Nałęcz-Jawecki G., Berry C., Brigmon R.L. 2008.** Biodegradation of Crude Oil and Distillation Products by Biosurfactant-Producing Bacteria. Polish J. of Environ. Stud. 17(1) : 87-94.
- Prakash B., Irfan M. 2011.** *Pseudomonas aeruginosa* is present in Crude Oil Contaminated sites of Barmer region (India). J. Bioremed. 2 : 129. doi: [10.4172/2155-6199.1000129](https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000129).
- Pruthi V., Cameotra S.S. 1995.** Rapid method of monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation techniques. Biotechnology. 9(4) : 271-277.
- Pucci O.H., Acuna A., Pucci G.N. 2013.** Biodegradation Waste of the Stations Service by *Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp. Acta biol. Colomb., 18 (2) : 251-258.
- Pulgarin A. 2012.** Méthodes pour la datation des hydrocarbures déversés dans l'environnement. Université de Sherbrooke, Québec, Canada. 79p.

- Rahman K.S.M., Rahman T.J., Perumal L., Samy P., Marchant R., Banat I.M. 2003.** The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta Biotechnol.* 23(4) : 335-345.
- Ramade F. 1992.** Précis d'écotoxicologie. Masson. 300p.
- Ramasdass K., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. 2018.** Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil : Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas spp.* on bioremediation. *Science of The total Environment.* 636(15) : 968-974.
- Reiling H.E., Thanei-wiss U., Guerra-santos L., Hirt R., Kapelli O., Fiechter A., 1986.** Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied environmental microbiology.* 51(5) : 985-989.
- Renoux A.Y. 1996.** Évaluation de bioprocédés d'assainissement en phase solide/liquide par l'utilisation de biotests écotoxicologiques. Thèse de Doctorat. Institut national de la recherche scientifique. Québec. 157p.
- Rhbal H., Souabi S., Safi M., Arad M., Anouzla A. 2010.** Hydrocarbons diagnostic of polluted soils. *Study & Research Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry.* 11 (4) : 449- 458.
- Rivelli V., Franzetti A. Gandolfi I. Cordoni S., Bestetti G. 2013.** Persistence and degrading activity of free and immobilised allochthonous bacteria during bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Biodegradation.* 24 : 1-11.
- Rivière J.L. 1998.** Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines. Tec et Doc. 204p.
- Rollin C., Quiot F., Denys S., Bureau J. 2005.** Hydrocarbures aromatiques polycycliques. Guide méthodologique. INERIS-66244 DESP-R01.85p.
- Romaniuk R. 2007.** Atenuación Natural Y Remediación Inducida En Suelos Contaminados Con Hidrocarburos. *CI. SUELO* 25(2) : 139-149.
- Rostami I., and Juhasz A.L. 2013.** Bioaccessibility-based predictions for estimating PAH biodegradation efficacy - Comparison of model predictions and measured endpoints. *Biodegradation.* 85: 323-330
- Rouquerol T., Amir H., Amir H. 1987.** Effet de l'épandage de résidus pétroliers 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.* 24(2) : 137-156.
- Roy S. 2021.** Pre-treatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. 1^{ère} Edition. CRC Press. 106 p.
- Roy A., Dutta A., Pal S., Gupta A., Sarkar J., Chatterjee A., Saha A., Sarkar P., Sar P., Kazy S.K. 2018.** Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresour Technol.* 253 : 22-32

- Ruley A.J., Tumuhairwe J.B., Amoding A., Opolot E., Oryem-Origa, Basamba T. 2019.** Assesment of plants for phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils in the sudd wetland of South Sudan. *Plant soil Environ.* 65 : 436-469.
- Saada A., Nowak C., et Coquereau N. 2005.** Etats des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures. Rapport intermédiaire. Résultats de la phase1. Rapport BRGM/RP-53739-FR. 107p.
- Sadoudi-Ali Ahmed D., Ali Ahmed S., Chergui R., Dahmani Y. 2014.** Treatment of an oil polluted soil by injecting *Pseudomonas aeruginosa* and produced rhamnolipid. *International Journal of Environmental Engineering Science and Technology Research.* 2(1) : 1-9.
- Safdari M.S., Kariminia H.R., Rahmati M., Fazlollahi F., Polasko A., Mahendra S., Wilding W.V., Fletcher T.H. 2018.** Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 15(342) : 270-278.
- Sakshi., Singh S.K., Haritash A.K. 2019.** Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation. *International journal of environmental science and technology.* 16(10) : 6489-6512.
- Savci S. 2012.** An Agricultural Pollutant : Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development.* 3(1) : 77-80.
- Schnoor J.L., Cutcheron S.C. 2003.** *Phytoremediation-Transformation and control of contaminants.* Wiley interscience. INC. USA. 987p.
- Scriban R. 1999.** *Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluants organiques.* 5ème Edition. Tec et Doc. 865p.
- Seklemova E., Pavlova A., Kovacheva K. 2001.** Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel : field demonstration. *Biodegradation.* 12 : 311-316.
- Semences de France.** [www.http//semencesdefrance.com](http://semencesdefrance.com)
- Shabih F., Amir H., Muhammad N., Temoor A., Muhammad S., Mohsin T., Imran S., Romana T. 2018.** Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future. *Protein Pept Lett.* 25(2) : 148-163.
- Siddiqui S., Adams W.A., Schollion J. 2001.** The phytotoxicity and degradation of diesel hydrocarbons in soil. *Journal of plant nutrition and soil science.* 164(6) : 631-635.
- Siles J.A., Margesin R. 2018.** Insights into microbial communities mediating the bioremediation of hydrocarboncontaminated soil from an Alpine former military site. *Applied Microbiology and Biotechnology.* <http://doi.org/10.1007/s00253-018- 8932-8936>.
- Silva-Castro G.A., Rodelas B., Perucha C., Laguna J., Gonzalez-Lopez J., Calvo C. 2013.** Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents: assays in a pilot plant. *Sci. Total Environ.* 446 : 347-55.

- Simarro R., Gonzalez N., Bautista L. F., Molina M. C. 2013.** Assessment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil : Change in bacterial community. *J. Hazard. Mater.* 262 : 158-167.
- Sist P., Bandiera A., Urbani R. 2020.** Soil PAH Rhizodegradation using *Festuca arundinacea* in an Urban Polluted Site in Trieste (Italy). *Res. J. Chem. Environ.* 24(12) : 1-15.
- Soleimani M., Farhoudi M., Christensen J.H. 2013.** Chemometric assessment of enhanced bioremediation of oil contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 254 : 372-381.
- Soltani M. 2004.** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat. Université Paris 6. 284p.
- Somtrakoon K., Chouychai W. 2013.** Phytotoxicity of single and combined polycyclic aromatic hydrocarbons toward economic crops. *Russian Journal of Plant Physiology.* 60 : 139-148.
- Song X., Hong E., Seagren E.A. 2014.** Laboratory-scale in situ bioremediation in heterogeneous porous media: Biokinetics-limited scenario. *Journal of Contaminant Hydrology.* 158 : 78-92.
- Sriram M.I., Gayathiri S., Gnanaselvi U., Jenifer P.S., Raj S.M., Gurunathan S. 2011.** Novel lipopeptide biosurfactant produced by hydrocarbon degrading and heavy metal tolerant bacterium *Escherichia fergusonii* KLU01 as a potential tool for bioremediation. *Bioresource Technology.* 102 : 9291-9295.
- Straube W.L., Jones-Mechane J., Pritchard P.H., Jones W.R. 1999.** Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbones. *Ressources, Conservation and Recycling.* 27 : 1-2.
- Suja F., Rahim I.R., Taha M.R., Hamzah A. 2014.** Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 90 : 115-122.
- Susarla S., Medina V.F., Cutcheron S.C. 2002.** Phytoremediation : an ecological solution to organique chemical contamination. *Ecological engineering.* 18 : 647-658.
- Suter G.W., Efrogmson R., Sample B.E., Jones D.S. 2000.** Ecological risk assessment for contaminated sites. CRC Press. 460p.
- Suthersan S.S. 1997.** Remediation Engineering. Design concept. CRC Press, Boca Raton, Floride. 362 p.
- Szulc A., Ambro-Zewicz D., Sydow M., Qawniczak Q., Piotrowska-Cyplik A., Marecik R., Chrzanowski Q. 2014.** The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil : Feasibility during field studies. *Journal of Environmental Management* 132 : 121-128.

- Tanee F.B.G., Kinako P.D.S. 2008.** Comparative studies of Bioremediation and Phytoremediation in the mitigation of Crude Oil Toxicity in Tropical Soil. *Journal App. Sci. Environ. Manage.* 12 : 143-147.
- Thavasi R., Jayalakshmi S., Banat I.M. 2011.** Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresource Technology.* 102 : 3366-3372.
- Tognane Mbendou E.P. 2013.** Production de bioéthanol à partir des résidus de bois : Cas de Moibi. *Mémoire de DI. P. SII* : 6-12.
- Triffault-Bouchet G., Gruyer N., Groleau P.E., Ouellet A., Dupont F. 2015.** Hydrocarbures pétroliers : caractéristiques, devenir et criminalistique environnementale. Centre d'expertise en analyse environnementale de Québec. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques, 41 p.
- Tuleva B.K., Ivanov G.R., Christova N. 2002.** Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 57(3-4) : 356-60.
- Unterbrunner R., Wieshammer G., Hollender U., Felderer B., Wieshammer-Zivkovic M., Puschenreiter M., Wenzel W.W. 2007.** Plant and fertiliser effects on rhizodegradation of crude oil in two soils with different nutrient status. *Plant Soil.* 300 : 117-126.
- Uthandi S., Kaliyaperumal A., Srinivasan N., Thangavelu K., Muniraj I.K., Zhan X. 2021.** Microbial biodiesel production from lignocellulosic biomass : New insights and future challenges. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1877045>
- Vallée T., Yıldızoglu M. 2004.** Présentation des algorithmes génétiques et de leurs applications en économie. *Revue d'économie politique.* 5 : 711-745.
- Velazquez-Aradillas J.C., Toribio-Jimenez J., Gonzalez-Chavez M.C.A., Bautista F. Cebrian M.E., Esparza-Garcia F.J., Rodriguez-Vazquez R. 2011.** Characterisation of a biosurfactant produced by a *Bacillus cereus* strain tolerant to cadmium and isolated from green coffee grain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 27(4) : 907-913.
- Verdin A., Lounes-Hadj Sahraoui A., Durand R. 2004.** Agents de la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures polycycliques aromatiques. *Revue francophone d'écologie industrielle.* 36 : 33-37.
- Vila M. 2006.** Utilisation de plantes agronomiques et lacustres dans la dépollution des sols contaminés par le rdx et le tnt : Approches en laboratoire. Thèse Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. 204p.
- Villalba Primitz J., Vázquez S., Ruberto L., Lo Balbo A., Mac Cormack W. 2021.** Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from Carlini Station, Antarctica : effectiveness of different nutrient sources as biostimulation agents. *Polar Biology.* 44 : 289-303.
- Villaverde J., Láiz L., Lara-Moreno A., González-Pimentel J.L., Morillo E. 2019.** Bioaugmentation of PAH-Contaminated Soils With Novel Specific Degradator Strains Isolated From a Contaminated Industrial Site. Effect of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin as PAH

Bioavailability Enhancer. *Front. Microbiol.* 14 November 2019.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02588>

Vogel T., Ballerini D. 2001. Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 16(3) : 204-209.

Winqvist E., Bjöklöf K., Schultz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., Cajthaml T., Steffen K.T., Jørgensen K.S., Tuomela M. 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi- From laboratory to field scale. *International Biodeterioration & Biodegradation* 86: 238-247.

Wu M., Dick W.A., Li W., Wang X., Yang Q., Wang T., Xu L., Zhang M., Chen L. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleumcontaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 107: 158-164.

Wu M., Ye X., Chen K., Li W., Yuan J., Jiang X. 2017. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 223 : 657-664.

Xu Y., Sun G.D., Jin J.H., Ying L., Mu L., Zhong Z.P., Liu Z.P. 2014. Successful **bioremediation** of an aged and heavily contaminated soil using a microbial/plant combination strategy. *J. hazard. mater.* 264 : 430-438.

Yaman C. 2020. Performance and Kinetics of Bioaugmentation, Biostimulation, and Natural Attenuation Processes for Bioremediation of Crude Oil-Contaminated Soils. *Processes.* 8 (883): 1-14.

Yilmaz F., Ergene A., Yalçın E., Tan S. 2009. Production and characterization of biosurfactants produced by microorganisms isolated from milk factory wastewaters. *Environ. Technol.* 1(13) : 1397-1404.

Yin , Qiang J., Jia Y., Ye J., H Peng., Qin H., Zhangn N., He B. 2009. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry.* 44 : 302-308.

Yousfi I., Mansouri N. 2004. Efficacité des algorithmes génétiques procédant par réduction successive pour l'identification des paramètres. *Sciences & Technologie* 22 : 17-21.

Zahermand S., Vafaeian M., Bazyar M.H. 2020. Analysis of the physical and chemical properties of soil contaminated with oil (petroleum) hydrocarbons. *Earth Sci. Res. J.* 24(2)
<https://doi.org/10.15446/esrj.v24n2.76217>

Zairi M., Rouis M.J., Shabou R. 2002. Étude expérimentale de la biorestauration des sols souillés par les hydrocarbures. *Déchets sci. tech.* 27 : 23-29.

Zuzolo D., Guarino C., Tartaglia M., Sciarillo R. 2021. Plant-Soil-Microbiota Combination for the Removal of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) : An In-Field Experiment. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.621581>

MATHEMATICAL OPTIMIZATION BY GENETIC ALGORITHMS OF BIOSTIMULATION IN A DIESEL-GASOLINE CONTAMINATED SOIL

S. ALI AHMED AND D. SADOUDI-ALI AHMED

Laboratoire PSEMRVC Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, UMMTO,
Université de Tizi Ouzou
UMMTO, Tizi Ouzou, Algeria

(Received 5 January, 2021; Accepted 23 June, 2021)

ABSTRACT

This work aimed to determine the optimal concentrations of inorganic fertilizers and the treatment duration in biostimulation of a diesel-gasoline contaminated soil by evaluating the soil biological quality, in an approach of sustainable development. The biological parameters considered in this study are the mineral carbon of the released CO₂ by the microbial respiration (C-CO₂), the microbial biomass and the germination of maize seeds. The optimization using genetic algorithms gave optimal concentrations of fertilizers which permit to restore the biological quality of the soil and to economize 0.627 kg and 0.361 kg of nitrogenous and phosphorous fertilizers respectively, in 1m² of soil over 20 cm depth, in only 6-6.5 weeks of the treatment. Laboratory and field experiments yielded results consistent with the optimal solutions given by the genetic algorithms optimization.

KEY WORDS : Hydrocarbons, Soil, Biostimulation, Optimization, Genetic algorithms

INTRODUCTION

The petroleum derived hydrocarbons represent the main energy source for the humanity but they are in turn, an important environmental polluting source (Romaniuk *et al.*, 2007; Doley and Barthakur, 2020). Remediation of contaminated sites can be achieved through physical (e.g. disposal in landfill, incineration), chemical (use of chemical oxidants), thermal and biological processes. The selection of suitable techniques for soil remediation must consider the impact on soil quality, which is of paramount importance for soil development. Bioremediation of soil and groundwater sites contaminated by petroleum hydrocarbons is known as a technically viable, cost-effective, and environmentally sustainable technology (Bento *et al.*, 2005; Silva-Castro *et al.*, 2013; Pucci *et al.*, 2013; Yuniati, 2018; Safdari *et al.*, 2018; Sist *et al.*, 2020). Low nutrient levels limited natural attenuation yields (Mendez-Vega *et al.*, 2007). Nutrient additions can stimulate petroleum hydrocarbon degradation (Wu *et al.*, 2016; Calvo *et al.*, 2019). Several studies have documented positive effects of biostimulation

in the attenuation of total petroleum hydrocarbons (Coulon and Dellile, 2003; Bento *et al.*, 2005; Silva-Castro *et al.*, 2013; Ron and Rosenberg, 2014; Bosco *et al.*, 2019; Brzeszcz, 2020). The application of biostimulation to decompose petroleum pollutants has been shown to be a promising technological alternative (Lin *et al.*, 2010; Chikere, 2012; Fukuhara *et al.*, 2013; Simarro *et al.*, 2013). But the use of excessive amounts of fertilizers can lead to surface and ground water contamination, air pollution and have toxicity on worms and microorganisms in soils (Good and Beatty, 2011; Savci, 2012). The fertilizers must be applied at the amounts really needed in the bioremediation process. Thus, the determination of the optimal concentrations of inorganic fertilizers is an important step to avoid excess which may cause other pollutions. This can be done by utilizing mathematical algorithms to optimize a multiple regression model (Huang *et al.*, 2008). For optimum biodegradation conditions, it is important to know the characteristics of the contaminated site before beginning the treatments. Basic information such as concentration of nutrients and treatment duration are needed. That is why, the optimal concentrations

of fertilizers and the treatment time must be determined. Genetic algorithms (GAs) are nowadays considered as powerful tools of optimization, even for complicated problems (Leardi, 2003; McCall, 2005; Ghaheiri, 2015). They are based on the mechanisms of natural selection and genetics. They combine a strategy of "survival of the strongest" with a random but structured exchange of information. For a problem for which a solution is unknown, a set of possible solutions is created randomly. This group is called "population". The characteristics (or variables to be determined) are then used in gene sequences that will be combined with other genes to form chromosomes and afterwards individuals. Each solution is associated with an individual, and this individual is evaluated and classified according to his resemblance to the best, but still unknown, solution to the problem. We can therefore hope, by combining the characteristics of powerful solutions, obtain even more efficient solutions (Cerf, 1996; Bäck *et al.*, 1997; McCall, 2005). They have been successfully applied to a wide range of real-world problems of significant complexity. GAs are a heuristic solution-search or optimisation technique, originally motivated by the Darwinian principle of evolution through (genetic) selection (McCall, 2005). The experiment aimed to determine the optimal concentration of fertilizers and the optimal time needed, in a biostimulation treatment, to restore the biological quality of a soil contaminated with gasoline and diesel, using GA optimization. The biological restoration of the soil was measured by the improvement of seed germination rate, microbial biomass and biological activity which expressed the bioavailability of hydrocarbons in the soil. The results given by the mathematical optimization were confronted with laboratory and field results obtained after application of the optimal solution.

MATERIAL AND METHODS

Optimization experimental design : The contaminated soil was collected from the surface layer soil (0-20cm) of a gas station situated in Kabylia (Algeria), sifted to 2mm. A biostimulation treatment was applied to stimulate the indigenous bacteria activity, by adding different doses of N and P fertilizers calculated basing on a ratio C/N/P of 100/10/1 (Abid *et al.*, 2014) taking in the account the rate of nitrogen and phosphorus contained initially in the soil (Table 1).

Table 1. Soil properties

Soil properties	
pH	7.2
OC (%)	8.84
N (%)	0.3
C/N	29.47
P ₂ O ₅ (mg/kg of soil)	5.46
CE (mmhos/cm)	0.74
Density (g/cm ³)	1.9
Clay (%)	21.4
Sand (%)	36.5
Silt (%)	42.1

The tested concentrations of fertilizers in 100g of soil were 0.125, 0.25, 0.375 and 0.5g of K₂HPO₄, corresponding respectively to the treatments P1, P2, P3 and P4 and 1.035, 2.07, 3.105 and 4.14g of (NH₄)₂SO₄ to the treatments noted N1, N2, N3 and N4 respectively. The fertilizers were added as solutions to 200 g of contaminated soil contained in glass bottles. The soils were kept under ambient temperature during 2, 4, 6 and 8 weeks corresponding respectively to T1, T2, T3 and T4. Each treatment was repeated in 6 bottles. The effectiveness of the treatments was evaluated in laboratory by assessing the soil microbial respiration and biomass and the toxicity on the seed germination of maize (*Zea mays*); a sensitive plant to hydrocarbon contamination (Chaineau *et al.*, 1996).

Biological activity: Soil respiration is commonly used as a relevant indicator of hydrocarbons biodegradation. Depressed biological activity signifies little involvement, while positive response indicates that indigenous microorganisms contribute in the hydrocarbons biodegradation (Margesin et Schinner, 2001), since the microbial respiration measures directly the microbial activity and reflects indirectly hydrocarbons degradation (Lin *et al.*, 2010). The soil treated with different fertilizers concentrations were used to assess the biological activity at the end of the incubation. The soil respiration was undertaken in glass bottles (as described previously). The released CO₂ was trapped in NaOH solution and measured by titration. Each bottle contained a pot filled with water to avoid the desiccation of the soil. This measurement served as fast and relatively easy determinant of the most efficient combination of fertilizer concentration and treatment duration.

Microbial biomass: The microbial biomass is a measure of the living fraction of the organic matter in the soil. It was determined by the fumigation

method described by Jenkinson-Powlson (1976) modified by Chaussod and Nicolardot (1982).

Ecotoxicological test A germination test is conducted to evaluate the toxicity of the residual hydrocarbons in the soil using maize seeds. 40 seeds were placed in each Petri-dish containing 100 g of each soil after addition of water to achieve 85% of holding capacity. Seeds were then covered with 90 g of clean sand and incubated at 20 °C during 15d (Winquist *et al.*, 2014). At the end of the test, the number of emerged seedlings was counted. The result was calculated as a percentage of germination.

The contaminated soil was analyzed to determine the initial statute. It was characterized by mineralized carbon (C-CO₂) of 1.28 mg/100g of soil, germination rate of 18.33% and microbial biomass of 0.09 mg/100 g of soil.

Mathematical methods : Multiple regressions, correlation matrix, GA optimization and graphical analysis were performed with R software. A correlation matrix was calculated to determine the linear relationships between the maize seed germination rate, the C-CO₂ released and the microbial biomass. The mathematical optimization of the biostimulation was effectuated by calculating at first, a multiple regression to establish the relationship between the effectiveness of the treatment (reflecting the soil biological quality) as a response variable and the concentration of the fertilizer and the treatment duration as explanatory variables. The obtained linear model was then optimized to get the solutions which were subjected to principal components analysis (PCA) in order to determine the best solution. Finally, all the optimal solutions were represented in a dendrogram to classify them to determine the class containing the best solutions.

Laboratory experiment One of the optimal solutions obtained above is applied in a laboratory test to validate the optimization results. One of the optimal concentrations of (NH₄)₂SO₄ and K₂HPO₄ obtained were applied. The contaminated soil (stored at 4°C) was sieved and incubated into bottles containing each 200g of soil to determine the biological activity, the microbial biomass and the percentage of germination of maize seeds after the optimal duration treatment.

Field experiment The optimal solution applied to validate the model in a laboratory experiment is applied in the field in order to estimate the efficiency

of the biostimulation in natural conditions. The experiment was carried out in the gas station from which the soil was sampled for the laboratory experiment. The soil analysis for carbon, nitrogen and phosphorus revealed concentrations in approx of those of the soil used in the laboratory experiments. On a parcel situated near the pollution source three soil samples were removed, weighed and the corresponding amounts of fertilizers were calculated. The soil samples were then put in mesh fabric bag, replaced and treated with the fertilizer solution. After the optimal duration given by the model, the soil samples were removed again and were subjected to the same analyzes.

RESULTS

Biological activity The efficiency of biostimulation was evaluated based on the amount of emitted CO₂ expressed by C-CO₂ (mineral carbon). The amount of emitted carbon dioxide by autochthonous microflora in biostimulated samples augmented with time. The best biological activity was observed after 6 and 8 weeks results obtained during this stage were presented in Table 2. The values of C-CO₂ measured were in the soil fertilized with the concentration N3P3 followed by those found in the soil treated with the concentration N4P4. The smaller value of C-CO₂ was obtained in the soil which received the lowest concentration (N1P1) incubated for only 2 weeks. It should be emphasized that the increase in fertilizers concentration is more effective when duration of the treatment is low, but overall, for a treatment of 4 weeks or more, the increase in the dose of fertilizers did not necessarily lead to a more intense biological activity.

Microbial biomass Soil microbial biomass increased with increasing fertilizer dose until the third concentration and then decreased slightly in the soil treated with N4P4. Higher doses stimulated the growth of microorganisms because they have got more nutrients. In all cases, the increasing in duration of treatment induced increasing in microbial activity (Table 2). This value doubled almost every time the duration increased by two weeks especially for the higher fertilizers concentrations (N3P3 and N4P4).

Seed germination When hydrocarbons are degraded sufficiently, the soil becomes less toxic for leaving organisms and for seeds. So, enhancement of the seeds germination indicates that the toxicity is

Table 2. Effect of fertilizers concentration and time duration on microbial activity and biomass and the germination rate of maize seeds.

Treatment	Microbial activity (mgC-CO ₂ /100g soil)	Microbial biomass (mg/100g soil)	Germination rate (%)
T ₁ N ₁ P ₁	18.33±1.35	0.28±0.01	62±2.14
T ₁ N ₂ P ₂	26.4±1.55	0.35±0.03	68.33±0.88
T ₁ N ₃ P ₃	43.75±0.83	1.21±0.05	83.5±1.05
T ₁ N ₄ P ₄	38.1±1.37	0.905±0.04	80.66±1.28
T ₂ N ₁ P ₁	36.81±1.01	0.425±0.06	74±0.81
T ₂ N ₂ P ₂	41.4±0.65	1.134±0.1	72.66±0.95
T ₂ N ₃ P ₃	61.6±0.53	2.475±0.22	85.33±1.05
T ₂ N ₄ P ₄	52.6±1.47	1.425±0.1	83.33±1.25
T ₃ N ₁ P ₁	33.7±0.74	0.28±0.01	73.33±1.4
T ₃ N ₂ P ₂	52.33±0.45	1.78±0.05	81.5±1.05
T ₃ N ₃ P ₃	66.73±0.71	5.035±0.25	95.66±1.14
T ₃ N ₄ P ₄	57.33±0.4	2.595±0.08	87.83±1.1
T ₄ N ₁ P ₁	43.45±0.48	1.28±0.1	75.33±2.96
T ₄ N ₂ P ₂	57.81±0.61	2.57±0.21	81.83±0.87
T ₄ N ₃ P ₃	63.06±0.8	3.88±0.13	90±1.48
T ₄ N ₄ P ₄	76.55±3.84	5.835±0.35	90.83±1.4

lowered in the soil. The toxicity of hydrocarbons in the soil was determined by inhibition of seed germination (Table 2).

After 2 weeks, the germination rate was less than 70% in the samples treated with N1P1 and N2P2. It was up to 80% after 2 and 4 weeks in the soils treated with the concentrations N3P3 and N4P4 and for all the tested concentrations after 6 and 8 weeks excepted the first concentration. The germination rate observed after 8 weeks in the soils which received N4P4 and after 6 weeks with the concentration N3P3 exceeded 90%. In these soils the inhibition of seed germination was less than 10%, indicating a very low toxicity due to the hydrocarbons dissipation. The toxicity in the soil decreased during the incubation as measured by seed germination. It must be noted that the highest GR (more than 95%) was obtained in the sample treated with N3P3 after 6 weeks.

Correlation: The biological parameters measured above correlated positively and strongly with each other. The matrix showed good correlation between the germination rate of maize seeds, the C-CO₂ and the microbial biomass (Table 3). This result indicates that when the microbial biomass is enhanced, the microbial respiration is more intensive, indicating an improvement in carbon mineralization. These lead to higher rate of maize seed germination.

Mathematical optimization Since the germination rate of maize is well correlated with the microbial activity and biomass, it was used in the

Table 3. The correlation matrix of the biological parameters (C-CO₂, Microbial biomass and germination rate)

	C-CO ₂	MB	GR
GR	1.0000000	0.8076779	0.8889943
MB	0.8076779	1.0000000	0.9027407
C-CO2	0.8889943	0.9027407	1.0000000

mathematical optimization as indicator of the effectiveness of biostimulation experiment which reflects the restoration of the soil biological quality. The multiple regressions calculated to explain the germination rate of maize seeds by the time duration and the fertilizers concentration are given in Table 4.

The low probability values indicated that both models are significant. The determination coefficient showed the goodness of fit and suggested that above 83% of the variance is attributed to the variables. The regression models were optimized using genetic algorithms. The fitness function aimed to obtain solutions which gave a germination rate up to 70%, and a population of 80 individuals (solutions) was requested. The individuals of this population are subjected to principal component analysis represented in Fig. 1.

The germination rate was more correlated with the fertilizer concentration than with the time of the treatment. The fertilizer concentration was negatively correlated with the treatment duration. So, when a higher concentration of fertilizers is

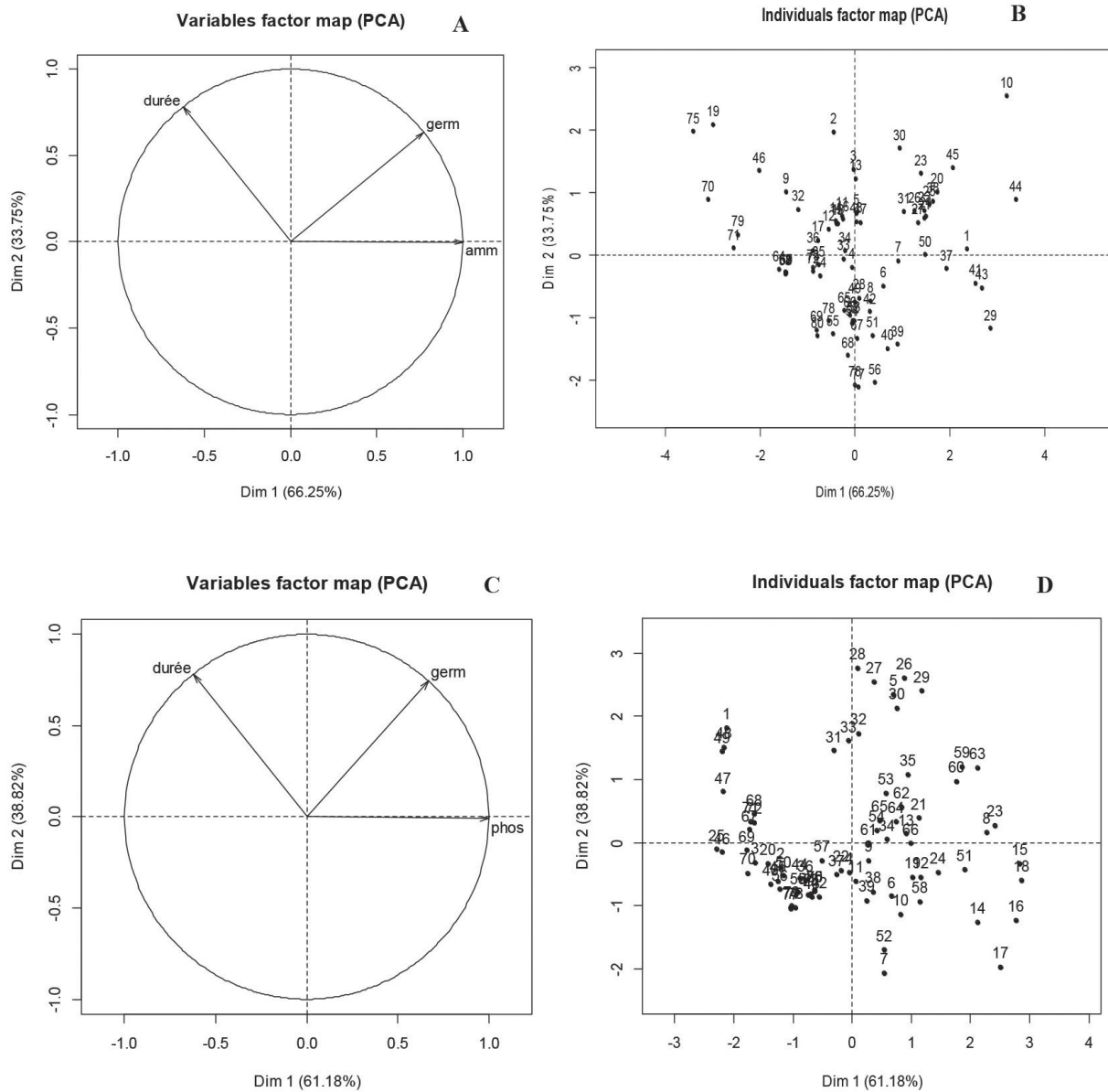


Fig. 1. Principle components analyses. Variables (A) and individuals (B) factor maps for the first model. Variables (C) and individuals (D) factor maps for the second model.

Table 4. The calculated regressions between germination rate and the fertilizers concentrations and the treatment duration

Explanatory variables	Regression model	Determination coefficient (R ²)	p-value
Treatment duration and (NH ₄) ₂ SO ₄ concentration	GR=2.9933C _N ***+1.92D***+55.3***	0.83	4.95.10 ⁻¹²
Treatment duration and K ₂ HPO ₄ concentration	GR=24.785C _P ***+1.92D***+55.3***	0.83	4.95.10 ⁻¹²

GR: germination rate of maize seeds; C_N: (NH₄)₂SO₄ concentration; C_P: K₂HPO₄ concentration; D: the treatment duration; the anova showed a very highly significant contribution of the treatment duration, the concentration of each fertilizer and the intercept (***)

applied, less time is needed to improve the germination rate. In the first model, the individual which gave the optimal germination rate was the 10th, characterized by a nitrogenous fertilizer concentration of about 3.975g/100g of soil and a duration time of 6 weeks. In the second model, the best individual was the 26th, characterized by a phosphorous fertilizer concentration of 0.405g/100g of soil and a duration time of about 6.75 weeks. The dendrograms (Fig. 2) showed that the solutions in approx with the optimal solution in the model 1 are contained in the 1st class and those of the second

model are contained in the 2nd class. Both the 1st and the 2nd contain 20 individuals.

Laboratory experiment : In the laboratory experiment, one of the optimal solutions was used. An individual was chosen in the class1 of the first model and another one in the class 2 of the second model. Both individuals have treatment duration in approx. So, 7.95g of ammonium sulfate and 0.83g of dipotassium hydrogen phosphate were used in 200g of soil incubated during 6.5 weeks. The obtained germination rate was 86.66%, These results are close to those obtained by the model. The use of

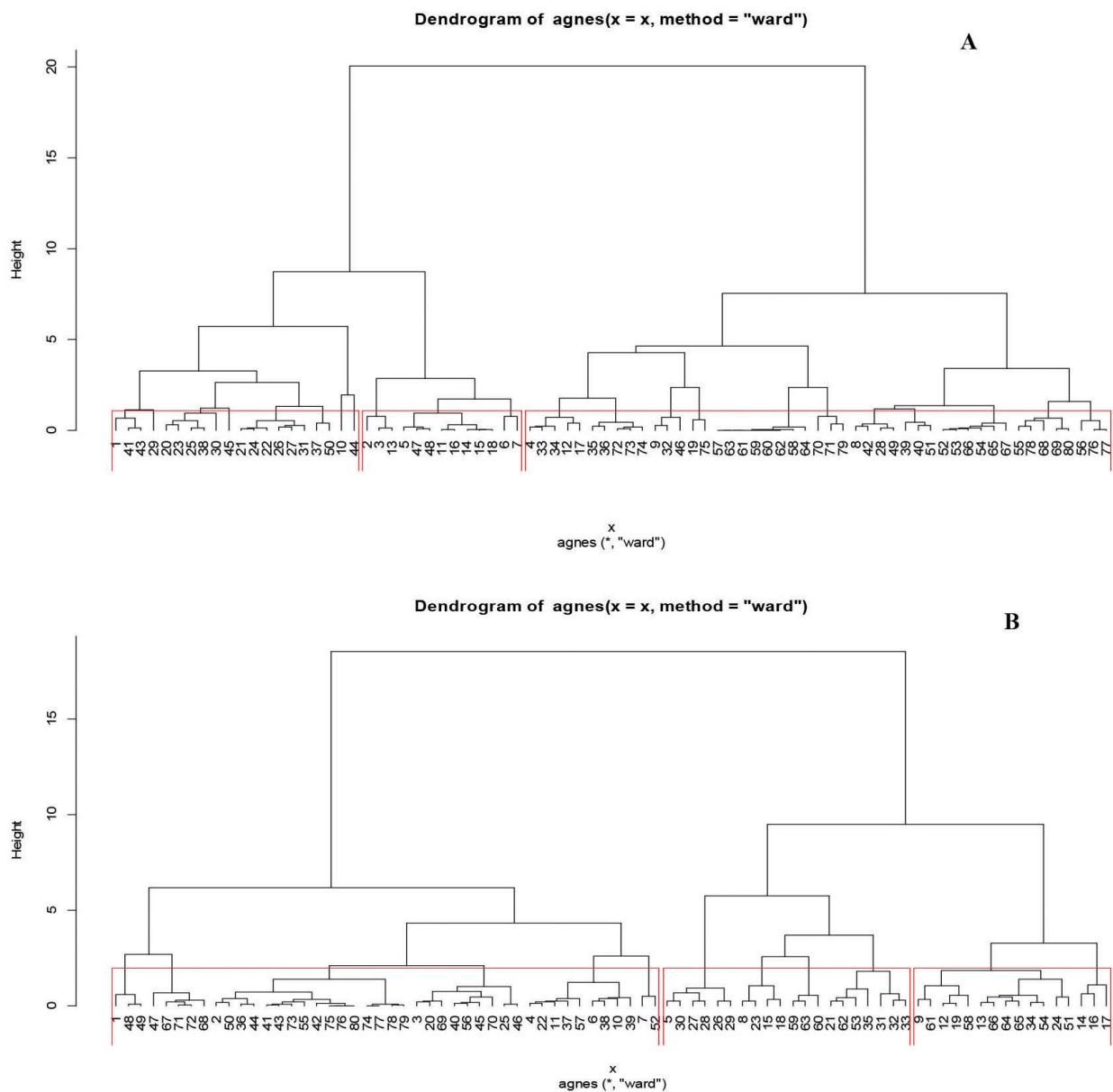


Fig. 2. Dendrograms with classes of the individuals characterized by treatment duration and nitrogen fertilizer concentrations (A), or treatment duration and phosphorous fertilizer concentrations (B).

optimized nutrient and treatment time yielded in results consistent with those generated by the GA. 6 The C-CO₂ and the microbial biomass were about 49mg/100g of soil and 1.92mg/100g of soil respectively (Fig. 3).

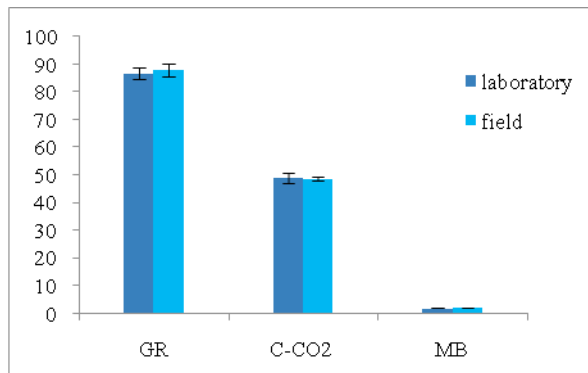


Fig. 3. Results of C-CO₂, MB and GR in the laboratory and the field experiments

Field experiment : After application of the optimal solutions of fertilizers concentrations, the soil was analyzed in laboratory after 6.5 weeks of treatment. The observed germination rate was 88% for maize seeds and the values obtained for the C-CO₂ and microbial biomass were respectively about 48.7mg/100g of soil and 2.15mg/100g of soil (Fig. 3). The results of the field experiment were slightly better than those of the laboratory experiment. The optimized concentrations of fertilizers and treatment duration were efficient even on the field.

DISCUSSION

The application of biostimulation with inorganic nutrients had favorable effect on the microbial respiration, and thus, on carbon mineralization (Braddock *et al.*, 1997; Margesin and Schinner, 2001; Ghaly *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2018). The microbial population was greater (Margesin and Schinner, 2001; Abid *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017; Bahmani *et al.*, 2018; Koshlaf, 2019). Several studies correlated the loss in hydrocarbons with the microbial biomass and activity. Siles and Margesin (2018) showed that high TPH removal rate was obtained after addition to the contaminated soil of inorganic fertilization. Safdari *et al.* (2018) found a percentage of hydrocarbon degradation of about 82%. Abid *et al.* (2014) noted relationship between the soil bacterial number and the removal rate of TPH. Yaman et bin Faisal (2020) also found that the biostimulation of a hydrocarbon-polluted soil

resulted in the reduction of 74% of TPH with a number of degrading bacteria two order of magnitude higher in comparison to control.

The degradation of gasoline and diesel oil in the soil by the stimulated indigenous bacteria enhanced the germination of maize seeds, since the soil was less toxic. The optimal duration of biostimulation was around 6 weeks. These results are in concordance with those of Wu *et al.* (2016), who observed a loss of 60% of TPH 6 weeks after the application of the biostimulation, and a plateau of degradation in the seventh week. A plateau has been also observed by Rostami *et al.* (2013) around the fifth week of incubation at 25°C of nutrient amended soil. Margesin and Schinner (2001) also noted that the removal of the hydrocarbons decreased with time because of a probable formation of polar compounds and the loss of labile compounds which led to a decline in microbial activity. The GA optimization for the fertilizers gave optimal concentrations of 3.975g and 0.405g/100g soil of ammonium sulfate and dipotassium hydrogen phosphate salts respectively. These concentrations are not the highest tested. Similar results were obtained by Braddock *et al.* (1997). Indeed, the authors have observed the greatest microbial activity at the lowest level of nutrient addition. Ramasdass *et al.* (2018) noted that the addition of the fertilizers at recommended bioremediation levels resulted in significant inhibition of hydrocarbon degradation. The optimal concentrations obtained by the GA optimization permit to economize 0.627kg of (NH₄)₂SO₄ and 0.361kg of K₂HPO₄ per m² of soil over depth of 20cm (with a density of 1.9g/cm³). In the laboratory and field experiments, the results confirmed the efficiency of the optimal solutions calculated by the GA. The high germination rate showed that the soil in both experiments was less toxic to maize seeds. Pelaez *et al.* (2013) found that more than 71% of total petroleum hydrocarbons have been degraded in biostimulation field experiment in less than 7 weeks. These authors have also observed a degradation rate of 72.6% in a laboratory biostimulation treatment after 8 weeks. Suja *et al.* (2014) have noted that the dissipation rate of TPH was higher in the field. This can be explained by the fact that the conditions in the field, which is an open system, are different and the loss in hydrocarbons is not due only to degradation but also to volatilization and leaching. According to Lors *et al.* (2012) the most important diminution in hydrocarbons concentration in the soil

was observed between 4 and 8 weeks with a slightly faster degradation in the field of 4- and 5-ring PAHs.

REFERENCES

- Abid, A. Zaafour, K. Aydi, A. Manai, I. Ben Hassen Trabesli, A. Messaoud, C. and Hamdi, M. 2014. Feasibility of a Bioremediation Process Using Biostimulation with Inorganic nutrient NPK for Hydrocarbon Contaminated Soil in Tunisia. *J. Biorem. Biodeg.* 5 (4) : 1-6
- Bäck, T. 1997. Evolutionary computation: comments on the history and current state. *IEEE Trans. Evol. Comput.* 1 : 3-17
- Bahmani, F. Ataei, S. A. and Mikaili-Kherameh, M. A. 2018. The Effect of Moisture Content Variation on the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soils: Modeling and Experimental Investigation. *J. Environ. Anal. Chem.* 5(2) : 2380-2391
- Bento, F. M. Camargo, F. A. O. Okeke, B. C. and Frankenberger, W. T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology.* 96: 1049-1055
- Bosco, F. Casale, A. Mazzarino, I. Godio, A. Ruffino, B. Mollea, C. and Chiampo, F. 2019. Microcosm evaluation of bioaugmentation and biostimulation efficacy on diesel contaminated soil. *J. Chemical Technology and Biotechnology.* <https://doi.org/10.1002/jctb.5966>
- Braddock, J. F. Ruth, M.L. and Catterall, P. H. 1997. Enhancement and Inhibition of Microbial Activity in Hydrocarbon-Contaminated Arctic Soils :Implications for Nutrient-Amended Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 31 (7) : 2078-2084
- Brzeszcz, J. Kapusta, P. Steliga, T. and Turkiewicz, A. 2020. Hydrocarbon Removal by Two Differently Developed Microbial Inoculants and Comparing Their Actions with Biostimulation Treatment. *Molecules.* 25 (661) : 1-23
- Calvo, C. Rodriguez-Calvo, A. Robledp-Mahon, T. Manzanera, M. Gonzalez-Lopez, J. Aranda, E. and Silva-Castro, G.A. 2019. Biostimulation of crude oil-polluted soils : influence of initial physiochemical and biological characteristics of soil. *International J. of Environmental Science and Technology.* 16 : 4925-4934
- Cerf, R. 1996. A New Genetic Algorithm. *The Annals of Applied Probability.* 6 (3) : 778-817
- Chaîneau, C. H. Morel, J. L. and Oudot, J. 1996. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26 (6) : 1478-1483
- Chikere, C. Surrudge, K. Okpokwasili, G. C. Cloete, T. E. 2012. Dynamics of indigenous bacterial communities with crude oil degradation during nutrient-inhanced bioremediation. *Waste Management and Research.* 30(3) : 225-236
- Coulon, F. and Dellile, D. 2003. Effects of Biostimulation on Growth of Indigenous Bacteria in Sub-Antarctic Soil Contaminated with Oil Hydrocarbons. *Oil and Gas Science and Technology - Rev. IFP.* 58 (4) : 469-479
- Doley, R. and Barthakur, M. 2020. Microbial degradation of naphthalene through *Bacillus cereus* 6 isolated from refinery oil sludge. *Pollution Research.* 39. Nov. Suppl. Issue : 166-172
- Fukuhara, Y. Horii, S. Matsuno, T. Matsumiya, Y. Mukai, M. and Kubo, M. 2013. Distribution of hydrocarbon degrading bacteria in the soil environment and their contribution to bioremediation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170 (2): 329-339
- Ghaehri, A. Shoar, S. Naderan, M. and Shahabuddin, S. 2015. The Applications of Genetic Algorithms in Medicine. *Oman Medical Journal.* 30(6) : 406-416
- Ghaly, A. E. Yusran, A. and Dave, D. 2013. Effects of Biostimulation and Bioaugmentation on The Degradation of Pyrene in Soil. *J. Bioremed. Biodeg.* S7:005. <http://doi.org/10.4172/s7-005-2155-6199>
- Good, A. G. and Beatty, P. H. 2011. Fertilizing Nature: A Tragedy of Excess in the Commons. *PLoS Biology.* 9(8): 1-9
- Huang, L. Mab, T. Li, D. Liang, F. Liu, R. L. and Li, G. 2008. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin.* 56 : 1714-1718.
- Koshlaf, E. Shahsavari, E. Haleyr, N. Osborn, A.M. and Ball, A. S. 2019. Effect of biostimulation on the distribution and composition of the microbial community of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated landfill soil during bioremediation. *Geoderma.* 338 : 216-225.
- Leardi, R. 2003. *Nature-inspired Methods in Chemometrics: Genetic Algorithms and Artificial Neural Networks.* Volume 23. Elsevier Science
- Lin, T.C. Pan, P. T. Cheng, S. S. 2010. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 176 : 27- 34.
- Lors, C. Damidot, D. Ponge, J. F. and Périé, F. 2012. Comparison of bioremediation process of PAHs in a PAH contaminated soil at field and laboratory scales. *Environmental Pollution.* 165 : 11-17
- Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology.* 67(7) : 3127-3133.
- Mendez-Vega, D. Gallego, J. R. Pelaez, A. I. De Cordoba, G. F. Moreno, J. Munoz, D. and Sanchez, J. 2007. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European J. of Soil Biology.* 43 : 310-321

- McCall, J. 2005. Genetic algorithms for modelling and optimization. *J. of Computational and Applied Mathematics*. 184 : 205-222
- Pelaez, A. I. Lores, I. Sotres, A. Mendez-Garcia, C. Fernandez-Velarde, C. Santos, J. A. Gallego, J. R. and Sanchez, J. 2013. Design and field-scale implementation of an "on site" bioremediation treatment in PAH-polluted soil. *Environmental Pollution*. 181 : 190-199
- Pucci, O. H. Acuna, A. and Pucci, G. N. 2013. Biodegradation of the residues of service and industrial washing stations by the strain *Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp. *Acta Biologica Columbiana*. 18(2) : 251-258 (Spanish)
- Ramasdass, K. Megharaj, M. Venkateswarlu, K. and Naidu, R. 2018. Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Science of The total Environment*. 636(15): 968-974.
- Romaniuk, R. Brandt, J. F. Rios, P. R. and Giuffr , L. 2007. Natural attenuation and remediation effects on hydrocarbons contaminated soils. *CI. SUELOS*. 25(2): 139-149 (Spanish)
- Rostami, I. and Juhasz, A. L. 2013. Bioaccessibility-based predictions for estimating PAH biodegradation efficacy - Comparison of model predictions and measured endpoints. *Biodegradation*. 85: 323-330
- Ron, E. Z. and Rosenberg, E. 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in Biotechnology*. 27 : 191-194.
- Roy, A. Dutta, A. Pal, S. Gupta, A. Sarkar, J. Chatterjee, A. Saha, A. Sarkar, P. Sar, P. and Kazy, S.K. 2018. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresour Technol*. 253 : 22-32
- Safdari, M.S., Kariminia, H.R., Rahmati, M., Fazlollahi, F., Polasko, A., Mahendra, S., Wilding, W.V. and Fletcher, T.H. 2018. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *J. Hazard Mater*. 15(342): 270-278.
- Savci, S. 2012. An Agricultural Pollutant : Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*. 3(1) : 77-80.
- Siles, J.A. and Margesin, R. 2018. Insights into microbial communities mediating the bioremediation of hydrocarboncontaminated soil from an Alpine former military site. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <http://doi.org/10.1007/s00253-018-8932-8936>.
- Silva-Castro, G.A. Rodelas, B. Perucha, C. Laguna, J. González-López, J. and Calvo, C. 2013. Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents : Assays in a pilot plant. *Science of The Total Environment*. 445 : 347-355
- Simarro, R. Gonzalez, N. Bautista, L.F. and Molina, M.C. 2013. Assesment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil : change in bacterial community. *J. Hazard. Mater*. 262 : 158-167.
- Sist, P. Bandiera, A. and Urbani, R. 2020. Soil PAH Rhizodegradation using *Festuca arundinacea* in an Urban Polluted Site in Trieste (Italy). *Res. J. Chem. Environ*. 24 (12) : 1-15.
- Suja, F. Rahim, I.R. Taha, M.R. and Hamzah, A. 2014. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 90 : 115-122.
- Winquist, E. Bj kl f, K. Schultz, E. Räsänen, M. Salonen, K. Anasonye, F. Cajthaml, T. Steffen, K.T. Jørgensen, K.S. and Tuomela, M. 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi- From laboratory to field scale. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 86 : 238-247.
- Wu, M. Dick, W.A. Li, W. Wang, X. Yang, Q. Wang, T. Xu, L. Zhang, M. and Chen, L. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 107: 158-164.
- Wu, M. Ye, X. Chen, K. Li, W. Yuan, J. and Jiang, X. 2017. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. *Environ Pollut*. 223 : 657-664.
- Yaman, C. and Bin Faisal, I.A. 2020. Performance and Kinetics of Bioaugmentation, Biostimulation, and Natural Attenuation Processes for Bioremediation of Crude Oil-Contaminated Soils. *Processes*. 8 (883): 1-14.
- Yuniati, M.D. 2018. Bioremediation of petroleum-contaminated soil : A Review. IOP Conf. Ser.: *Earth Environ. Sci*. 118 012063 <http://doi.org/10.1088/s012063-118-1-1755-1315>.
-