

ORIGINAL RESEARCH PAPER

**DECONTAMINATION DES SOLS POLLUES PAR LES
HYDROCARBURES**

**DECONTAMINATION OF SOILS POLLUTED BY
HYDROCARBONS**

**Hicham Rhbal¹, Salah Souabi¹, Mohamed Safi¹, Mohamed Terta²,
Mohamed Arad³, Abdelkader Anouzla^{1*}, Mohamed Hafidi⁴**

¹*Université Hassan II, Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia,
Département Génie des Procédés et Environnement, Mohammedia, Morocco*

²*Université Hassan II FSTM Laboratoire de Virologie et Hygiène &
Microbiologie, Mohammedia, Morocco*

³*La société anonyme d'industrie et de raffinerie, Laboratoire control de qualité,
Mohammedia, Morocco*

⁴*Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Samlalia, Département de Biologie
laboratoire d'Ecologie et Environnement Unité associé au CNRST, URAL 32,
Marrakech, Morocco*

*Corresponding author: aanouzla@gmail.com

Received: September, 05, 2018

Accepted: January, 22, 2020

Abstract: Bioremediation is a viable process used to treat contaminated lands by hydrocarbons. It can be improved by the use of organic waste. The overall study objective was the evaluation of the impact of an organic substrate (active sludge) in decontaminating petroleum hydrocarbons polluted sites through the composting system. As a result, both wastes from petroleum refinery and industrial sources (hydrocarbon polluted sites and the activated sludge) are mixed at different percentages B, C, D, (soil/activated sludge 6/4, 7/3, 8/2) respectively in addition to a control system A (100 % soil). The physic-chemical parameters are controlled in order to assure that the composting process is running correctly. The study has shown that bioremediation via composting process is very efficient at reducing the concentration of pollutants and evaluating organic wastes that are high in nutritional elements. The composting process can be thus considered as a means of solid waste management.

Keywords: *active sludge, composting, petroleum hydrocarbons,
solid waste management*

INTRODUCTION

La production à long terme et l'utilisation des dérivées pétrolières ont causé une large contamination des sols, des nappes phréatiques, des sédiments, des eaux surfaciques, et de l'air. Le besoin de remédier cet environnement a mené au développement d'un nombre important de technologies telles que la bio remédiation [1]. A présent il n'existe pas de guide environnemental pour définir le point final précis du processus de bio remédiation. Historiquement, dans le cas des sols contaminés par les hydrocarbures, le point final du processus de bioremédiation est basé sur le niveau de composé toxique restant dans le sol [2]. Bien que beaucoup de sols superficiels contiennent des bactéries natales et des moisissures capables de dégrader les HAP (hydrocarbures polycycliques aromatiques) et d'autre hydrocarbures, L'adaptation de ses communautés microbiennes arrive par : (i) l'introduction d'enzymes impliquées dans la biodégradation de ces polluants et/ou (ii) une augmentation du nombre de microorganismes capables de réduire ces polluants. Les microorganismes indigènes ont été appliqués pour réduire la concentration des hydrocarbures contaminant le sol [3], ils sont largement utilisés dans la bioremédiation in situ [4]. L'activité microbienne est souvent stimulée par l'addition du matériel organique du sol. L'incorporation des amendements organiques affecte l'activité enzymatique du sol, car le matériel additionné peut contenir des enzymes endo ou exo cellulaires et peut aussi stimuler l'activité microbienne du sol [5]. En fait la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell [6]. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter. En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres bactériens prédominants sont *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligènes*, *Vibro*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacteria*, et *Nocardia*. Ces micro-organismes qui dégradent les hydrocarbures sont ubiquistes, ils furent repérés même dans les écosystèmes extrêmes comme les régions polaires, les déserts ou les sources chaudes [7]. En outre, l'épuration des eaux résiduaires par le procédé de boue activée est principalement basée sur l'activité métabolique de cultures bactériennes. Gallego *et al.* [8] ont reporté que l'addition de la boue activée issu des eaux usées domestiques aux plantes a augmenté le taux de dégradation des hydrocarbures en grande partie. De ce fait, nous utiliserons la boue activée provenant d'une station d'épuration des eaux usées pour la remédiation des terres polluées par les hydrocarbures pétroliers. Le procédé susceptible d'être utilisé est le processus du compostage. Ceci a été démontré être effectif dans la biodégradation des HAP, chlorophénols, polychlorés, biphenyle, les explosifs et les hydrocarbures pétroliers [9, 10]. Bien que beaucoup de sols superficiels contiennent des bactéries natales et des moisissures capables de dégrader PAHS et d'autre hydrocarbures, le compostage peut aider dans la dégradation des hydrocarbures, c'est un processus contrôlé, de dégradation des constituants organiques, par une succession de communautés microbiennes évoluant en condition aérobie et entraînant une montée de température. Des travaux précédents [11] ont indiqué que la perte de PAHS dans un mélange composté a été dirigée par des mécanismes biologiques.

Brady et Weil [12] ont aussi examiné pendant le compostage, des changements relatifs aux populations microbiennes qui peuvent être contribué à la biodégradation de PAHS. Des études ont montré [13] que le compostage est une bonne méthode pour réduire les PAH contenu dans des sols contaminés. Lazzari *et al.* [14] ont observé une diminution

de 25 % comme résultat du compostage de la boue activée. La réduction dans le contenu du PAH observé par Moeller and Reeh [15] est au niveau de 18 - 74 %. Brändli *et al.* [16] ont observé une diminution de PAH avec un faible poids moléculaire (par 50 - 90 %), Cai *et al.* [17] ont noté que, selon la méthode de compostage, les PAH contenus dans la boue activée peuvent être diminués de 64 à 94 %.

La matière organique améliore aussi les propriétés physico-chimiques du sol pareil comme l'humidité, l'aération, le pH, la capacité d'échange ionique [12]. Ces propriétés physico-chimiques peuvent influencer la population microbienne indigène et accroître leur capacité à dégrader les hydrocarbures et autre Carbone [18].

Larsen et McCartney [19] ont trouvé une biodégradation optimale avec un C/N de 29. Plus généralement il semble que des C/N compris entre 25 et 40 permettent un compostage satisfaisant [20, 21]. La température est fréquemment utilisée pour le jugement de l'efficacité et le degré de stabilisation du processus de traitement [11]. C'est le facteur clé du compostage, elle constitue l'élément principal d'hygénisation d'un compost qui dépend de la nature du procédé et de la durée de maintien de cette température [22]. Le pH est un paramètre qui intervient essentiellement par son rôle sélectif sur la microflore responsable de la décomposition des déchets initiaux. Le pH optimal est de 5,5 - 8,0 [23 - 25]. La teneur en eau et la nature de sa liaison avec les constituants du compost conditionnent la capacité de démarrage du processus de compostage et la création d'un biotope favorable au déroulement des processus biologiques [26]. Le compostage permet aussi une dépollution de sols contaminés par du pétrole : raffinerie, désert Koweïtien [27].

L'objectif de ce travail est d'étudier la décontamination des sols pollués par les hydrocarbures. Pour ce faire nous avons suivis le devenir des hydrocarbures après l'effet de boue activée à différentes doses (terres / boues). Il s'agit d'évaluer le rôle de boue active riche en élément minéraux (N, P) et en microorganismes dans la dégradation de ces polluants.

MATERIEL ET METHODE

Origine des boues

Les boues activées utilisées dans cette étude, proviennent de la station d'épuration des eaux usées, cette dernière est située dans une société d'industrie et de raffinerie (SAMIR). Du fait de la position de leader de cette société dans le marché pétrolier au Maroc et de sa très grande production des dérivés pétroliers (essence, kérosène, jet, gasoil, bitume), la SAMIR consomme et traite une quantité importante d'eaux, par conséquent, elle génère des quantités importantes de la boue activée. Cette dernière considérée comme déchets organique est riche en éléments nutritifs et elle contient des microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures. Les caractéristiques physico chimiques de la boue sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des boues de la STEP et des sols de la SAMIR

Paramètres	Boues	Sol
Siccité (% b.h.)	21	80,8
CE [$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$]	4,94	17,50
CEC [$\text{meq}/100\text{ g}$]	14,9	17,4
Solides totaux % [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	6,1	84,9
Densité [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	0,85	1,2
pH	7,95	6
Carbone total (C) [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	298	71
Azote total (N) [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	45,3	2,35
Rapport C/N	6,7	29,83
Soufre (S) [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	0,95	0,9
Phosphore (P) [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	3,97	2,3
Calcium (Ca) [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	0,27	11
Magnésium (Mg) [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	1,09	4
Sodium (Na) [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	0,87	3,7
Potassium (K) [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	2,21	2,1

Siccité (% b.h.) - siccité qui est sur base humide (b.h.)

CEC - capacité d'échange cationique en milliéquivalent mequiv [100] g^{-1}

CE - conductivité électrique en millisiemens par centimètre

Origine des terres et ses réparations

Le sol contaminé par les hydrocarbures utilisés pour cette étude et obtenu comme un échantillon composite provient d'une décharge propre de la société de raffinerie SAMIR. Le facteur âge des polluants, source d'un changement significatif du comportement des hydrocarbures, a été retenu pour la représentativité des échantillons utilisés pour l'étude. La procédure de prélèvement et la préparation du sol est reporté par Birnstingl [28]. Le sol est séché à l'air libre et homogénéisé par passage à travers un tamis de 5 mm suivie par un tamis de 2 mm, selon la norme AFNOR [29]. Ses caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 1, selon la méthode réalisée par Rhbal *et al.* [30].

Minéralisation:

Une prise d'essai de 0,2 g de sol (fraction inférieure à 2 mm) séché et broyé, 0,5 g pour les échantillons de chaque compost est placé dans un matras de 50 mL avec 10 mL d'acide salicylique/sulfurique (25 g d'acide salicylique dissous dans 1 L d'acide sulfurique concentré 36 N). Les matras sont agités puis laissés au repos. L'ensemble est porté à 80 °C pendant une heure (augmentation de la température par palier de 5 °C/min). Les matras sont ensuite refroidis et on a ajouté 0,5 g du catalyseur Kjeldahl (K_2SO_4 : 50g, CuSO_4 : 5 g et Sélénium : 0,5 g). Les échantillons sont alors chauffés (1h30 min à 150 °C ; rampe de montée en température : 5 °C/min), avant d'être portés à ébullition (300 °C ; au moins 03 heures ; rampe de montée en température : 5 °C/min). La minéralisation étant considérée comme terminée lorsque les premières décolorations

apparaissent (obtention d'un minéralisat blanchâtre). 20 mL d'eau distillé sont ajoutés après refroidissement à température ambiante.

Distillation :

Les matras sont installés dans l'appareil de distillation, 10 mL d'acide borique ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sont ajoutés dans une fiole de 100 mL, placé à la sortie du condenseur, de sorte que le tube plonge dans la solution. 20 mL d'hydroxyde de sodium (10 M) sont injectés via une pompe. 40 mL de distillat sont finalement collectés après distillation. Les distillats sont alors titrés avec de l'acide sulfurique ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) en présence d'indicateur coloré (0,1 g de vert de bromocrésol et 0,02 g de rouge de méthyle dissous dans 100 mL d'éthanol 95 %). La teneur en azote minérale, est déterminée selon l'expression suivante :

$$N (\%) = \frac{Ca (V_1 - V_2) \times M_N}{P} \times 100$$

où :

N : Azote NTK

V1 : Volume, en mL, d'acide sulfurique utilisé dans l'essai à blanc

V2 : Volume, en mL, d'acide sulfurique utilisé pour le dosage de l'échantillon

Ca : concentration en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de la solution de H_2SO_4 utilisée pour le titrage ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

MN : Masse molaire de l'azote en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

P : Masse, en g, de la prise d'essais séché à l'air libre

Protocole

Le sol est dilué par homogénéisation avec le sable (1/1) pour fournir une distribution homogène d'hydrocarbures puis il est conditionné avec les boues activées comme amendement. Trois différents pourcentages du mélange ont été utilisés (sol/boue active : 6/4, 7/3, 8/2), cette composition satisfait les exigences des nutriments (C/N 40-50) conformément au système Cornell [31]. Pour diminuer le compactage du mélange et favoriser l'aération, des coupeaux de bois ont été rajoutés aux mélanges. L'essai a duré 90 jours. Le tas est couvert par une capuche, pour empêcher des déperditions de chaleur mais sans affecter l'aération, ce dernier est assuré par des retournements manuels qui ont été effectués une fois par jour. Durant le traitement, on a collecté 10 g d'échantillons dans plusieurs points de chaque microcosme (du fond, du milieu et le plus haut), puis on les a bien mélangés, on a extrait des échantillons représentatifs (30 g) de ce mélange pour déterminer ses caractéristiques physico chimiques (pH, conductivité électrique, carbone, azote, phosphore, rapport C/N) et les hydrocarbures selon la méthode décrite par Rhbal *et al.* [30]. L'humidité a été ajustée à 60 - 70 %. Durant le traitement les apports d'eaux sont effectués en cas de besoins. Le pH est mesuré avec pH-mètre model Crison micro pH 2000 (Crison, Barcelona, Spain) selon la méthode French industriel standard Authority X31-103 [32]. Le contenu de l'azote total (NTK) est déterminé par la méthode Kjeldahl selon la norme française ISO 11261, 1995 [33]. La conductivité électrique est mesurée selon la méthode décrite dans la référence [34], la teneur en carbone organique total (COT, en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de MS à 105°C) est déterminée selon la méthode décrite dans la référence [35], le phosphore disponible est déterminé selon la

méthode décrite dans la référence [36]. La température est surveillée journalièrement dans différents points avec une sonde de thermomètre numériques, à l'intérieur et la surface du compost.

Analyse des hydrocarbures

Selon la méthode réaliser par Rhbal *et al.* [30], la détermination des hydrocarbures est réalisée le jour même du prélèvement. 25 g d'échantillons sont soumis à une forte agitation pendant 15 mn dans 50 mL du tétrachlorure de carbone (CCl_4). Le mélange est laissé se décanter pendant 30 minutes. La phase liquide obtenue est filtrée à travers un papier filtre Whatman GF/A glass micro fibre contenant du sulfate de sodium (Na_2SO_4) dans l'ordre de retenir tous les traces d'eau. L'extrait filtré est passé à travers une colonne de silice pour retenir toute la matière organique autre que les hydrocarbures. Finalement, la concentration des hydrocarbures est mesurée par spectrophotométrie infrarouge (The FT-IR was performed using Thermo Scientific™ Nicolet iS5 at $2,930\text{ cm}^{-1}$ absorbance according to ASTM D7066-4 with $0,1\text{ }\mu\text{L}$ injection volume of TPH extract [37]).

Identification microbiologique

Préparation des échantillons

- 10 g d'échantillon du troisième compost (sol/boue active 8/2) du mélange est suspendu dans 100 mL d'eau peptonnée tamponnée et laissé sous agitation durant 1 h à $130\text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$.
- On prépare une série de dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dans l'eau peptonnée tamponnée (9 mL/tube),
- On dépose 1 mL des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dans des boîtes de Pétri et on verse après le milieu PCA température à $45\text{ }^\circ\text{C}$. PCA est un milieu ordinaire de dénombrement, sans inhibiteurs le but étant de compter l'ensemble des bactéries dans un échantillon donné.
- Les boîtes de Pétri sont incubées à $37\text{ }^\circ\text{C}$ durant 24 heures. Pour chaque dilution on effectue 3 répétitions et les boîtes contenant 30 à 300 colonies sont retenues pour le comptage. Le nombre de CFU (Colonies Forming Unites) correspond au produit de l'inverse de la dilution fois nombre de colonies divisé sur volumeensemencé.
- Pour purifier et isoler les souches bactériennes, on a étalé en surface $0,1\text{ mL}$ de chaque dilution sur le milieu gélose nutritive, qui est un milieu d'isolement non-sélectif. Cet isolement est réalisé dans le but de séparer les différents micro-organismes qui pourront être ainsi étudiés individuellement après leur réincubation sur une autre boîte de milieu gélosé pour l'obtention d'une souche pure.

L'identification des souches bactériennes est basée sur le schéma d'identification suivant :

Chaque colonie purifiée est prélevée et diluée dans 1 mL d'eau physiologique. On procède à une observation microscopique après coloration de Gram et à une série de tests biochimiques classiques en vue d'une identification éventuelle par les tests préliminaires suivants : Coloration Gram, Recherche de la Catalase par H_2O_2 , Recherche de l'oxydase, Réduction des Nitrates.

Identification par galerie API 20 E

L'identification peut se faire par une galerie commerciale API 20 E. Cette technique est une méthode rapide et facile du fait qu'on peut réaliser les différents tests microbiologiques sur une seule galerie, et à partir d'une seule suspension bactérienne. La lecture des résultats se fait juste après 24 heures d'incubation.

RESULTATS ET DISCUSSION

Evolution de la température

La Figure 1 présente l'évolution de la température des mélanges (Sol/Boue active = 6/4, 7/3, 8/2) et du système de contrôle (100 % sol).

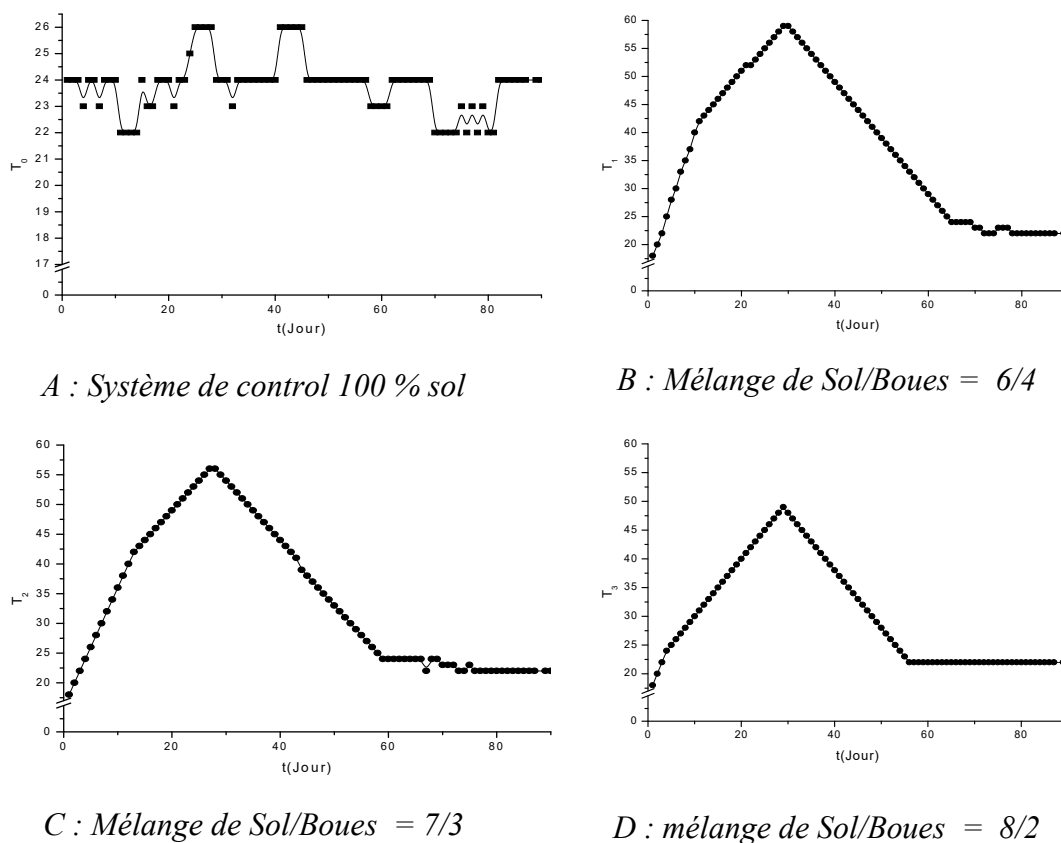


Figure 1. L'évolution de la température des mélanges (Sol/Boue active= 6/4, 7/3, 8/2) et du système de contrôle (100 % sol)

L'étude de l'évolution de la température au cours du processus du compostage montre son augmentation dans les trois mélanges B, C et D, cette évolution est étendue aux alentours des 10, 12 et 20 premiers jours respectivement pour atteindre 40 °C (la phase mésophile). A ce moment commence la phase thermophile qui a duré presque 20 jours, cette phase débute où les températures des mélanges B, C et D augmentent au-delà de 40 °C et atteignent 59 °C, 55 °C et 49 °C respectivement. La phase de dégradation (phase mésophile et thermophile) est suivie par une période de ralentissement de l'activité

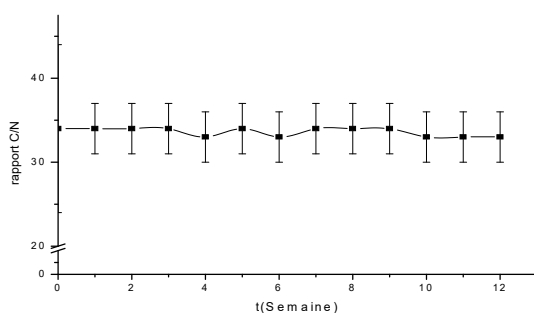
microbienne, pendant laquelle la température diminue graduellement jusqu'à la température ambiante (phase de refroidissement), pour les trois composts B, C et D cette phase a duré de 34, 26 et 25 jours respectivement. Après la phase de refroidissement, la température reste constante jusqu'à la fin du traitement (90 jours) pour les trois composts.

La forte augmentation de température observée dans la phase (mésophile et thermophile) du compost B était à cause de la charge initiale élevée microbienne et de la forte teneur en azote dans le compost B, en raison du taux élevé de la boue activée dans ce microcosme, ce qui a donné lieu à des activités métaboliques élevées. Les autres traitements C et D ont une évolution de la température moins élevée et proportionnelle, alors que dans le système de contrôle où aucune activité ne s'est manifestée, la température n'a pas évolué. Certains auteurs ont souligné un principe de cause à effet entre le taux de substrat organique et la chaleur générée mais aussi avec le taux de biodégradation des hydrocarbures pétroliers [38, 39]. L'élévation de la température provoque des réactions physico-chimiques et biologiques (métabolique et/ou cométabolique) qui, à travers elles, favorisent le rapprochement intime des matrices (sol/substrat) et par conséquent la solubilité des hydrocarbures pétroliers : une condition idéale pour rendre ces derniers biodisponibles et biodégradables par les microorganismes. Cette analyse rejoint la pensée de certains chercheurs [40] « La température est un facteur clé dans la biodégradation des hydrocarbures récalcitrants comme les HAP » et/ou d'autres, quand ils déclarent que « Les hydrocarbures pétroliers, en dépit de leur hydrophobicité, se solubilisent graduellement dans l'eau en fonction de l'augmentation de la température, tandis que leur coefficient de partage (K_{oe}) diminue de 20 à 30 % par 10 degrés générées » [41 – 43].

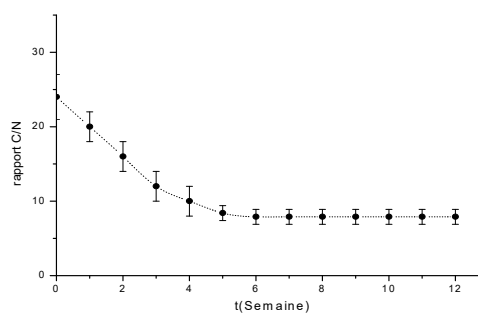
Rapport C/N

Les rapports C/N des mélanges (Sol/Boue active = 6/4, 7/3, 8/2) et du système de contrôle (100 % sol) sont présentés par la Figure 2.

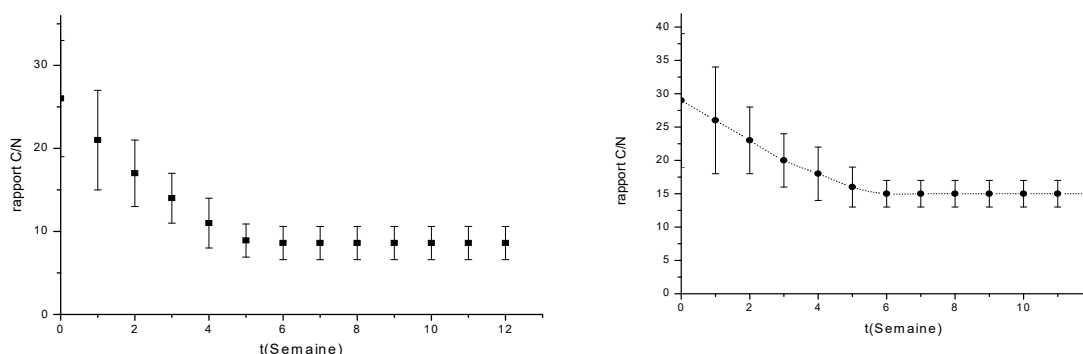
Dans les trois mélanges B, C et D, le rapport C/N a montré une diminution rapide et s'est stabilisé pendant la phase de maturation à des valeurs 7,9, 8,6, 15 respectivement. Cette diminution du rapport C/N, peut être due à la présence d'azote au début du traitement qui est adéquate au bon déroulement du compostage. McMillen et Gray [44], considèrent qu'un rapport C/N de 100/5 est favorable à la biodégradation de déchets de pétrole riche en hydrocarbures. En fait, la biodégradabilité d'un déchet organique est dépendante de son rapport C/N afin d'assurer un bon équilibre en nutriments nécessaires au développement optimal de la biomasse.



A : Système de contrôle 100 % sol



B : Mélange Sol/Boues = 6/4



C : Mélange Sol/Boues = 7/3

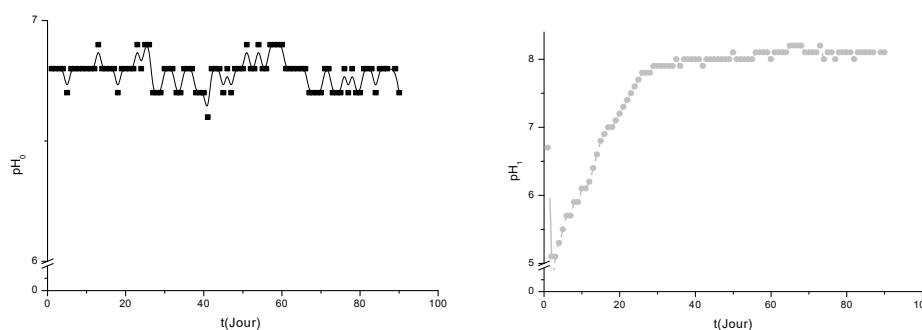
D : Mélange Sol/Boues = 8/2

Figure 2: Evolution du C/N au cours des traitements (A, B, C, D)

L'azote organique du substrat se minéralise en ammonium (NH_4^+) et nitrate (NO_3^-) lorsque la nitrification va jusqu'à son terme. Cet azote minéral est réincorporé dans le métabolisme microbien au cours de la dégradation des hydrocarbures. En outre, le rapport C/N présente une déclinaison progressivement à cause de la minéralisation des composés carbonés facilement disponibles. Cette diminution peut être expliquée par le fait que les micro-organismes consomment plus de carbone (composant principal des molécules organiques) que l'azote. D'autres auteurs [29, 30] ont montré que le rapport C/N diminue au cours du compostage pour arriver à des valeurs généralement comprises entre 8 et 25 ce qui s'explique par le fait que les micro-organismes consomment plus de carbone que d'azote. Siméon et al. [45] ont montré une décontamination par biodégradation des sols pollués par les hydrocarbures aromatiques polycycliques en présence de substrats organiques supplémentaires, cette dégradation a été obtenue par le billet d'une biophile composée de 75 % de sol pollué, 10 % d'inoculum (boues acclimatées), 10 % de boues brutes et 3 % de paille (pour améliorer le niveau d'aération).

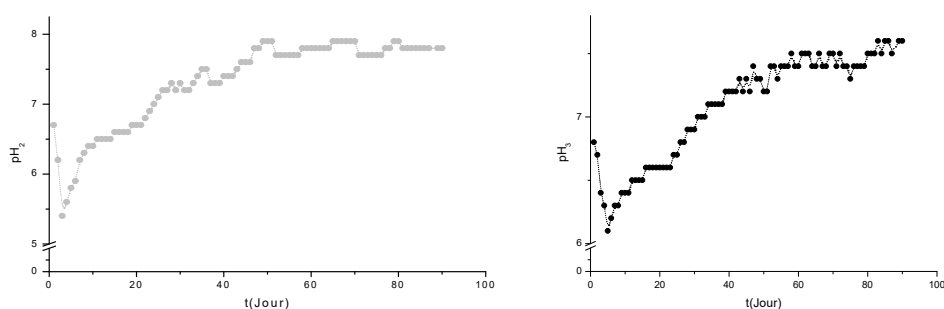
Variation de pH

Les variations de pH durant le compostage des trois mélanges (Sol/Boues activées = 6/4, 7/3, 8/2) et du système de contrôle (100 % sol) sont illustrées dans la Figure 3.



A : Système de control 100% sol

B : Mélange Sol/Boues = 6/4



C : Mélange Sol/Boues = 7/3

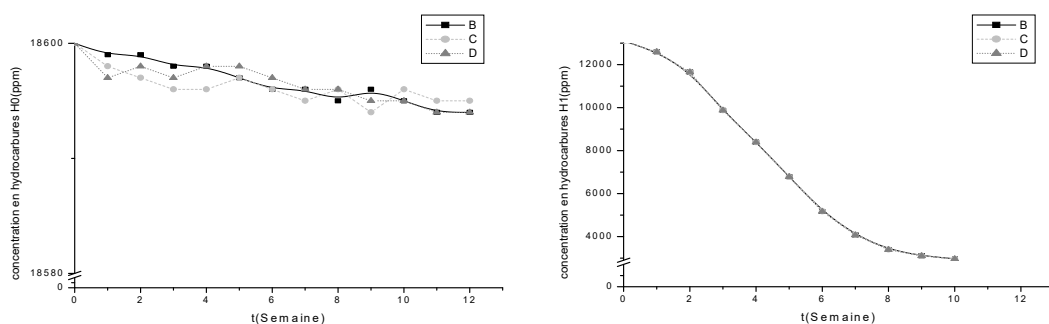
D : Mélange Sol/Boues = 8/2

Figure 3. La variation de pH durant le compostage des trois mélanges (Sol/Boues activées = 6/4, 7/3, 8/2) et du système de contrôle (100 % sol)

La valeur du pH est en fonction de la production des composés organiques acidifiés accumulés et de leur décomposition, la dégradation de ces composés acidifiés entraîne la libération de CO_2 et de la chaleur [46]. Quand le taux de production des acides est plus grand que leur taux de décomposition, la valeur de pH diminue. Dans le cas où les taux des deux phénomènes (production et décomposition) sont égaux, le pH atteint son minimum. Ces résultats ont montré que le mélange à grande quantité de boues activées (sol/Boues 7/3) a un temps d'acidification faible (48 h) par rapport au second mélange (sol/boues 8/4) (72 h), alors que le troisième mélange de faible quantité de boue activée (sol/Boues 6/4) a montré une durée plus grande d'acidification (120 h). Ceci paraît logique car les trois microcosmes ont des pourcentages différents de boues. En fait, la présence d'oxygène acidifie le mélange et les microorganismes du milieu dégradent ces acides en formant le CO_2 et H_2O ainsi que la chaleur, donc plus le milieu est riche en microorganismes, plus le temps d'acidification devient court. Dans le processus de compostage, l'ammonium (NH_3) est largement émis, alors que la matière organique est activement décomposée [47]. En effet, pour le premier mélange (sol /boues 7/3) le pH atteint une valeur de 8,1 alors qu'au deuxième mélange (sol /boues 8/4) le temps de maturation est moins long par rapport au mélange précédent et la valeur de pH atteint 7,8. Le troisième mélange qui contient le moins d'éléments nutritifs et moins de boues (sol/Boues 6/4), atteint un pH de 6,9 et son temps de maturation est plus court. Nous avons noté qu'à la fin du processus du compostage, le pH tend vers une valeur basique, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Cayuela *et al.* [48], Charnay [49]. Ces derniers ont observé une élévation du pH pendant le compostage des déchets riches en hydrocarbures.

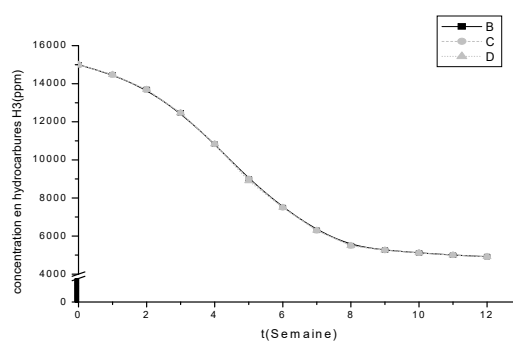
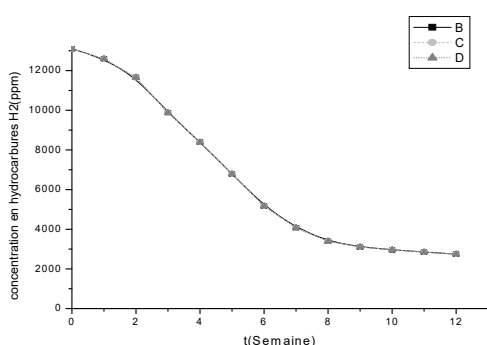
Concentration des Hydrocarbures

Les variations de la concentration des hydrocarbures durant notre traitement des trois mélanges (Sol/Boues = 6/4, 7/3, 8/2) et du système de contrôle (100 % sol) sont illustrées sur la Figure 4.



A : Système de control 100 % sol

B : Mélange Sol/Boue activée = 6/4



C : Mélange Sol/Boue activée = 7/3

D : Mélange Sol/Boue activée = 8/2

Figure 4. Variation de la concentration des hydrocarbures durant notre traitement des trois mélanges B, C et D respectivement (Sol/Boues = 6/4, 7/3, 8/2) et du système de contrôle A (100 % sol)

La réduction des hydrocarbures dans le système de control (100 % sol), est très faible, presque négligeable (Figure 4A). Cela apparait logique, car nous avons travaillé avec des échantillons du sol situé dans une décharge anciennement polluée, le sol est déjà influencé par des phénomènes naturels tel que la bio remédiation intrinsèque, la photo oxydation, donc les hydrocarbures qui existent dans nos microcosmes sont ceux qui ont persisté à ces phénomènes, leur réduction est presque négligeable. Dans le mélange B (sol/boue : 6/4), a lieu une diminution considérable dans la concentration des hydrocarbures, le niveau de la perte des hydrocarbures durant les 6 premiers semaines atteint 58 % et après 12 semaine du traitement, la concentration des hydrocarbures a diminué jusqu'au 91 % (Figure 4B). Dans le deuxième mélange (Sol/Boues = 7/3), la perte des hydrocarbures est exaltée, mais moins que dans le premier compost. Durant les 6 semaines, la réduction des hydrocarbures atteint 49 % et à la fin du traitement, ce pourcentage a augmenté jusqu'à 71 % (Figure 3c). Alors qu'au troisième traitement, mélange (Sol/Boues = 8/2), le suivie des hydrocarbures dans la première période de traitement (6 semaines) atteint 28 % et après les 3 mois de traitements, la diminution de la concentration des hydrocarbures a augmenté vers 59 % (Figure 4). Selon Liu et Cole [50], la bio remédiation exploite la diversité génétique et la polyvalence métabolique des microorganismes. L'étude réalisée par Solano-Serena *et al.* [51] concernant la

biodégradation des hydrocarbures contenus dans le sol par la microflore de boues activées de station d'épuration a montré que les microflore de sols présentent une capacité de dégradation large (85 % au minimum). En fait, les boues extraites d'une station d'épuration biologique des eaux polluées par les hydrocarbures pétroliers est riche d'éléments nutritifs ainsi que des microorganismes capables de dégrader ces polluants. Morris *et al.* [52] ont montré que des populations mixtes sont nécessaires pour dégrader significativement les polluants contenus dans les eaux usées rejetées par les raffineries. Un sol qui contient des hydrocarbures va modifier l'activité de ces microorganismes. Ceux-ci doivent donc adapter leur activité enzymatique afin de pouvoir s'y attaquer. Vecchioli *et al.* [53] soutiennent que l'amélioration des populations initiales de microorganismes peut mener à une meilleure capacité de dégradation des hydrocarbures polluants le sol.

Les bactéries et champignons vont ensuite subir une période de forte croissance au cours de laquelle ils seront capables d'assimiler les produits de la dégradation des hydrocarbures. Cette biodégradation peut prendre plusieurs mois. Une fois qu'ils ont consommé les composés les plus facilement dégradables, leur nombre diminue jusqu'à atteindre de nouveau la taille d'une population normale.

Parfois, seule une partie des polluants est dégradés car les hydrocarbures se lient partiellement à la matière organique du sol et deviennent alors moins accessibles aux microorganismes.

Dénombrement des populations bactériennes

Différents types de bactéries ont été isolés durant notre étude. Les isolats identifiés appartenaient à des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Klyvera*, *Escherichia coli*. Ces mêmes types de bactéries ont été déjà testés pour leur potentiel d'utilisation des hydrocarbures [54]. La recherche et l'isolement des souches dominantes impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers a révélé la présence des colonies bactériennes d'aspects et de formes différents. Certaines souches étaient capables de produire une pigmentation verte sur le milieu King B, diffusant dans toute la boîte de Pétri. Ces observations ont fortement orienté le diagnostic et l'identification vers le groupe fluorescent des *Pseudomonas*. L'utilisation de la galerie API20E a mis en évidence certaines espèces composées, de différents types de bactéries en particulier *Klebsiella*, *Klyverra*, *Serratia* et *E. coli*. Ces bactéries appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* qui est connu par *Pseudomonas*. Ces espèces sont beaucoup étudiées et rapportées comme des gènes dégradant les HAP et d'autres polluants organiques [55]. Ils sont connus par la sécrétion de la pyoverdine siderephores qui est caractéristique de ce groupe. Les espèces de *Pseudomonas* produisant la pyoverdine sont essentiellement *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens*. Les souches pigmentées ont poussé aussi bien sur le milieu Mac Conkey. Par cet aspect, de plus, la capacité de l'espèce à former des biofilms et à s'agréger lui donne une importance dans le domaine de la bioremédiation, particulièrement dans le processus des boues activées où sa floculation lui permet de rester dans les boues plus de temps, la protégeant ainsi de la prédation.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'examiner l'effet de mélange des boues avec du sol pollué par les hydrocarbures selon différents pourcentages (Sol/Boue active = 6/4, 7/3, 8/2) afin d'éliminer les hydrocarbures contenus dans les terres polluées par le processus de compostage. Le principal avantage provient de l'origine indigène des micro-organismes, qui sont présents dans le mélange et qui s'adaptent avec les conditions du milieu tout en dégradant la pollution organique. Or lorsqu'une pollution pétrolière apparaît dans un milieu, les microflore capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers se développent automatiquement. La capacité de ces micro-organismes à biodégrader les contaminants se traduit par la présence des paramètres physico-chimiques adéquats, de métabolisme spécialisé et de cométabolisme entre souches de bactéries. Chacun des paramètres étudiés a conduit à une information sur l'état d'avancement du compostage. Le dénombrement des souches bactériennes ont permis aussi de donner une idée sur les différents genres bactériens existant au cours de la bio remédiation. Le suivi de la concentration en hydrocarbures pendant le traitement a montré que la grande perte d'hydrocarbures est dans le mélange (sol/boues : 6/4) suivi du mélange (sol/ boues : 7/3) alors que dans le mélange (sol/boues : 8/2) l'élimination des hydrocarbures est la plus faible.

Les résultats de ce travail semblent montrer que les objectifs initialement fixés ont été atteints. En fait, la bioremédiation du sol pollué par les hydrocarbures avec la boue activée via le processus de compostage, est techniquement faisable avec des propriétés physico-chimiques acceptables, et peut être considéré comme une voie écologique pour l'élimination des hydrocarbures. Les perspectives de ce travail sont encore nombreuses, notamment en ce qui concerne l'étude détaillée sur ce type de compost. Ce travail peut fournir de nouvelles données, utiles à la politique locale sur le traitement et la gestion des déchets d'industrie en particulier la pollution du sol par les hydrocarbures. La dépollution des sols par voie biologique est un axe de recherche qui se développe de manière importante depuis quelques années.

REFERENCES

1. Head, I.M.: Bioremediation: towards a credible, *Microbiology*, **1998**, 144, 599-608;
2. Saterback, A., Toy, R.J., McMain, B.J., Williams, M.P., Dorn, P.B.: Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2000**, 19, 2643-2652;
3. Ritter, W.F., Scarborough, R.W.: A review of bioremediation of contaminated soils and ground water, *Journal of Environmental Health*, **1995**, 30, 323-330;
4. Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., Lal, B.: Evaluation of inoculums addition to stimulate in situ bioremediation of oily sludge-contaminated soil, *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**, 67, 1675-1681;
5. Goyal, S., Mishra, M.M., Dhankar, S.S., Kapoor, K.K., Batra, R.: Microbial biomass turnover and enzyme activities following the application of farmyard manure to field soils with and without previous long-term applications, *Biology Fertility Soils*, **1993**, 15, 60-64;
6. Zorpas, A.A., Arapoglou, D., Panagiotis, K.: Waste paper and clinoptilolite as a bulking material with dewatered anaerobically stabilized primary sewage sludge (DASPSS) for compost production, *Waste Management*, **2003**, 23, 27-35;

7. Soltani, M.: Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone, PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, **2004** ;
8. Gallego, J.L.R., Lorego, J., Llamas, J.F., Vasquez, F., Sanchez, J.: Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation, *Biodegradation*, **2001**, **12**, 325-335;
9. Potter, C.L., Glaser, J.A., Chang, L.W., Meier, J.R., Dosany, M.A., Herrmann, R.F.: Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions, *Environmental Science & Technology*, **1999**, **33**, 1917-25;
10. Namkoong, W., Hwang, E.-Y., Park, J.-S., Choi, J.-Y.: Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting, *Environmental Pollution*, **2002**, **119**, 23-31;
11. Diaz, M.J., Eugenio, M.E., Jimenez, L., Madejon, E., Cabrera, F.: Modelling vinasse/cotton waste ratio incubation for optimum composting, *Chemical Engineering Journal*, **2003**, **93** (3), 233-240;
12. Brady, N.C., Weil, R.R.: The nature and properties of soils, 13th edition, Prentice Hall Publishers, London, **1998**;
13. Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J., Beck, A.J.: Investigation of organic matter dynamics during in-vessel composting of an aged coal-tar contaminated soil using fluorescence excitation-emission spectroscopy, *Chemosphere*, **2006**, **64**, 839-847;
14. Lazzari, L., Sperti, L., Bertin, P., Pavoni, B.: Correlation between inorganic (heavy metals) and organic (PCBs and PAHs) micro pollutant concentrations during sludge composting processes, *Chemosphere*, **2000**, **41**, 427-435;
15. Moeller, J., Reeh, U.: Degradation of DEHP, PAHs and LAS in source separated MSW and sewage sludge during composting, *Compost Science & Utilization*, **2003**, **11**, 370-378;
16. Brändli, R.C., Bucheli, T.D., Kupper, T., Mayer, J., Stadelmann, F.X., Tarradellas, J.: Fate of PCBs, PAHs and their source characteristic ratios during composting and digestion of source-separated organic waste in full-scale plants, *Environmental Pollution*, **2007**, **148** (2), 520-528;
17. Cai, Q.Y., Mo, C.H., Wu, Q.T., Zeng, Q.Y., Katsoyiannis, A., Féraud, J.F.: Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes, *Journal of Hazardous Materials*, **2006**, **142** (1-2), 535-542;
18. Wellman, D.E., Ulery, A.L., Barcellona, M.P., Duerr-Auster, S.: Animal Waste-enhanced degradation of hydrocarbon-contaminated soil, *Soil Sediment Contaminat*, **2001**, **10**, 511-523;
19. Larsen, K.L., McCartney, D.M.: Effect of C:N ratios on microbial activity and N retention: bench-scale study using pulp and paper biosolids, *Compost Science & Utilization*, **2000**, **8**, 147-159;
20. Leclerc, B.: Guide des matières organiques, Editions Guide Technique de l'ITAB, **2001**;
21. Sadaka, S., El-Taweel, A.: Effects of aeration and C/N ratio on household waste composting in Egypt, *Compost Science & Utilization*, **2003**, **11** (1), 36-40;
22. Martens, J.: Indicator methods to evaluate the hygienic performance of industrial scale operating Biowaste Composting Plant, *Waste Management*, **2005**, **25**, 435-444;
23. Healy, M.G., Fenton, O., Forrestal, P.J., Danaher, M., Brennan, R.B., Morrison, O.: Metal concentrations in lime stabilized, thermally dried and anaerobically digested sewage sludges, *Waste Management*, **2016**, **48**, 404-408;
24. Zobell, C.E.: Action of microorganisms on hydrocarbons, *Bacteriology Reviews*, **1946**, **10**, 1-49;
25. Sundberg, C.: Improving compost process efficiency by controlling aeration. Temperature and pH, PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, **2005**, 109;
26. Ginkel Va, J.T., Van Haneghem, I.A., Raats, P.A.C.: SE-Structures and environment: physical properties of composting material: gas permeability, oxygen diffusion coefficient and thermal conductivity, *Biosystems Engineering*, **2002**, **81** (1), 113-125;
27. Al-Daher, R., Al-Awadhi, N., El-Nawawy, A.: Bioremediation of damaged desert environment using the windrow soil pile system in Kuwait, *Environment International*, **1998**, **24**, 175-180;
28. Birnstingl, J.G.A.: An investigation into the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a manufactured gas plant soil, PhD thesis, University of Lancaster, **1997**;
29. AFNOR, recueil des normes françaises, qualité des sols, AFNOR Edition, **1994**, **250 P**;
30. Rhabal, H., Souabi, S., Safi, M., Arad, M., Anouzla, A.: Hydrocarbons diagnostic of polluted soils, *Scientific Study & Research - Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, **2010**, **11**(4), 449-458;

31. Somasundaran, P., Zhang, L., Zheng, J., Ososkov, V., Chou, C.: Removal of nonvolatile hydrophobic compounds from soils by flotation. I. Laboratory investigation using a mechanically agitated machine, *Advances in Environmental Research*, **1997**, 1 (2), 157-165;
32. Quality of soils, French Industrial Standards Authority X 31 - 103, French Industrial Standards Authority; Quality of soils; **1994**;
33. Norme NF ISO 11261, juin **1995** (dosage de l'azote total du sol)
34. Jackson, M. L., *Soil Chemical Analysis*, Prentice-Hall, New York, NY, USA, **1964**;
35. ISO. **1995**. Norme ISO 10694. Qualité du sol - dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire).
36. Olsen, S. R. and L. E. Sommers, "Determination of available phosphorus," in *Methods of Soil Analysis*, A. L. Page, R.H. Miller, and D. R. Keeney, Eds., p. 403, American Society of Agronomy, Madison, Wis, USA, **1982**.
37. 32. ASTM D7066-04, *Standard Test Method for Dimer/Trimer of Chlorotrifluoroethylene (S-316) Recoverable Oil and Grease and Nonpolar Material by Infrared Determination*, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA, **2011**.
38. Larney, F.J., Olson, A.F.: Windrow temperatures and chemical properties during active and passive aeration composting of beef cattle feedlot manure, *Can. J. Soil Sci.*, **2006**, 783-797;
39. Hillel, D., Hatfield, J.L., Powlson, D.S., Rosenzweig, C., Scow, K.M., Singer, M.J., Sparks, D.L.: Encyclopedia of Soils in the Environment, *Geoderma*, **2006**, 132, 240-246;
40. Hogan, J.A.: Composting for soil remediation, in: *Biological treatment of hazardous wastes*, (Editors: Lewandowski, G.A., De Filippi, L.J.), John Wiley & Sons, New York, **1997**, 373-395;
41. Luers, F., Hulscher, E.M.: Temperature effect of the partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between natural organic matter and water, *Chemosphere*, **1996**, 33, 643-657;
42. Piatt, J.J., Backhus, D.A., Capel, P.D., Eisenreich, S.J.: Temperature-dependent sorption of naphthalene; phenanthrene; and pyrene to low organic carbon aquifer sediments, *Environmental Science & Technology*, **1996**, 30, 751-760;
43. Bonten, L.T.C., Grotenbuis, T.C., Rulkens, W.H.: Enhancement of PAH biodegradation in soil by physicochemical pretreatment, *Chemosphere*, **1999**, 38 (15), 3627-3636;
44. McMillen, S.J., Gray, N.R.: Biotreatment of Exploration and Production Wastes, SPE 27135, presented at the Second International Conference on Health, Safety & Environment in Oil & Gas Exploration and Production, Jakarta, Indonesia, January, **1994**, 25-27;
45. Siméon, N., Mercier, G., Blais, J.F., Ouvrard, S., Cébron, A., Leyval, C., Goergen, J.L., Guedond, E.: Décontamination de sols pollués par les hydrocarbures aromatiques polycycliques par biodégradation en présence de substrats organiques supplémentaires, *Revue du génie et de la science de l'environnement*, **2008**, 7 (5), 467-479;
46. Sundberg, C.: Improving Compost Process Efficiency by Controlling Aeration. Temperature and pH, PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, **2005**, 109;
47. Kuroda, K., Hanajima, D., Fukumoto, Y., Suzuki, K., Kawamoto, S., Shima, J., Haga, K.: Isolation of thermophilic ammonium-tolerant bacterium and its application to reduce ammonia emission, *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, **2004**, 68 (2), 286-292;
48. Cayuela, M.L., Sanchez-Monedero, M.A., Roig, A.: Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes, *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 616-623;
49. Charnay, F.: Compostage des déchets urbains dans les Pays en Développement. Elaboration d'une démarche méthodologique pour une production pérenne de compost, PhD Thesis, Université de Limoges, **2005**, 277;
50. Liu, X., Cole, M.A.: Minimum effective compost addition for remediation of pesticide contaminated soil, in *The Science of Composting*, (Editors: de Bertoldi, M., Bert, P., Tiziano, P.) Blackie Academic and Professional, London, **1996**, 903-912;
51. Solano-Serena, F., Marchal, R., Vandecasteele, J.P.: Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement: de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants, *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, **2001**, 56 (5), 479-498;
52. Morris, P.J., Shelton, M.E., Chapman, P.J.: Contaminated sites: Biodegradation of fossil fuels in the presence of PCBs in: *Bioremediation of recalcitrant organics* (Editors: Hinchee, R.E., Anderson, D.B., Hoeppe, R.E.), Battelle Press, Columbus, OH, **1995**, 123-130;
53. Vecchioli, G.I., Del Panno, M.T., Paineira, M.T.: Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil, *Environmental Pollution*, **1990**, 67, 249- 258;

54. Moneke, A., Nwangwu, C.: Studies on the bioutilization of some petroleum hydrocarbons by single and mixed cultures of some bacterial species, *African Journal of Microbiology Research*, **2011**, 5 (12), 1457-1466;
55. Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A.I., Drainas, C.: Isolation and characterization of novel bacteria degrading poly- cyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils, *Applied - Microbiology and Biotechnology*, **2004**, 65, 124-131.