

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Abou Bekr Belkaid  
Tlemcen Algérie



جامعة أبي بكر بلقايد

تلمسان الجزائر

## Faculté des Sciences

### Département de Chimie

Domaine : Sciences de la Matière (SM)

Filière : Chimie

Promotion : 2012 - 2013

Option : Chimie Physique et Analytique Académique /Professionnel

### Investigation de l'efficacité de certaines techniques de bioremediation de pollution par HAP.

**Nom:** NEGGAH épouse MEDEJDOUB

**Prénom:** Kenza

#### Présentée devant le Jury composé par :

Président : ABDELOUAHID D.E. Mètre de conférence

Examineur : NEGADI L. Professeur

Examineur : ZIANI CHERIF C. Professeur

Encadreur: BENSAOULA A. A. Mètre de conférence

2012-2013

## REMERCIEMENTS :

Ce travail a été réalisé au laboratoire de spectrochimie et pharmacologie structurale. J'exprime ma reconnaissance au professeur Dahmani Benamar pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au sein de son laboratoire pendant cette recherche.

Je remercie Monsieur BENSAOULA A. A, Maître de conférences, d'avoir accepté d'encadrer ce travail jusqu'à son aboutissement et pour la grande liberté qu'il m'a laissée dans mon travail, tant en recherche que pour la rédaction de ce mémoire. Je suis sensible à l'honneur que m'ont fait Monsieur, ABDELOUAHID D.E président de ce jury, Monsieur ZIANI CHERIF C et Madame NEGADI L, d'être rapporteurs de ce travail, et je les en remercie.

Je tiens également à remercier chaleureusement mes parents Abdelaziz et Hafida, mon mari Mustapha, ma belle mère Zahia, mon frère Aissa, mes sœurs Amina ;Fatima Zohra et Ikhlasse et ma belle sœur Nadia qui m'ont apporté tout leur soutien dans les bons comme les mauvais moment, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon affection... je vous aime fort

Merci aussi à toutes mes collègues et je remercie surtout mon groupe Badra ; Hanifa ; Noria ; Samra et Mohammed. Sans oublier mon oncle Ismail et ma seule copine Sarah.

## Résumé :

Les HAP sont des contaminants qui menacent tous les écosystèmes de l'environnement, on spécifiant l'être humain, donc il doit chercher des solutions dans un but de dégrader ces HAP.

Ils existent plusieurs méthodes pour la dépollution, dans ce mémoire on fait appeler à une de ces méthodes qui est la bioremédiation. Cette technique utilise des procédés biologiques où on va utiliser les microorganismes.

Dans ce mémoire on va appliquer quelques techniques de la bioremédiation sur le sol qui est présente la base de notre nourriture, où on va dépolluer le sol avec le diesel avec la présence des bactéries F10 et leur nutriment, et on va suivre la dégradation des HAP au cours de temps.

Pour analyser les HAP on va utiliser comme méthode d'analyse la HPLC avec un détecteur UV, les résultats obtenus vont discuter.

Mots clé : pollution, Hydrocarbures aromatiques polycycliques, bioremédiation.

## Abstract:

PAHs are contaminants that threaten ecosystems the entire environment, specifying the human being, so he must find solutions in order to degrade these PAHs.

They exist several methods for remediation in this memoir is made to call one of these methods is bioremediation. This technique uses biological processes which we will use microorganisms.

In this memoir we will apply some techniques of bioremediation on the ground that this is the basis of our food, which we will clean up the soil with diesel F10 with the presence of bacteria and nutrient, and we will follow PAH degradation over time.

To analyze PAHs we will use as a method of analysis by HPLC with UV detection, the results will be discussed.

Keywords: pollution, polycyclic aromatic hydrocarbons, bioremediation.

## Liste des tableaux

- Tableau 1 : HAP émis par les différentes sources naturelles
- Tableau 2 : HAP émis par les différentes sources anthropiques
- Tableau 3 : propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires
- Tableau 4 : Demi-vies des HAP par bioremédiation dans le sol
- Tableau 5 : Exemples de microorganismes dépollueurs
- Tableau 6 : Porosité, perméabilité et potentiel d'adsorption
- Tableau 7 : référence des longueur d'ondes max
- Tableau 8 : La détection des HAP dans pour chaque échantillon.
- Tableau 9 : courbes obtenus par le détecteur UV
- Tableau 10 : comparaison des conditions chromatographiques

## Liste des figures

- Figure 1 : Formules structurales des seize HAP prioritaires de la liste de l'EPA  
Figure 2 : les phénomènes contrôlant le devenir des polluants dans les différentes phases de sols  
Figure 3 : Dégradation aérobie de la matière organique  
Figure 4 : Dégradation anaérobie de la matière organique  
Figure 5 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet  
Figure 6 : Appareillage de HPLC-UV  
Figure 7 : chromatogramme d'étalonnage de la solution commerciale  
Figure 8 : le chromatogramme d'étalonnage obtenu par notre appareil HPLC  
Figure 9 : le chromatogramme de 3<sup>ème</sup> échantillon 1<sup>er</sup> prélèvement  
Figure 10 : le chromatogramme de 3<sup>ème</sup> échantillon 2<sup>ème</sup> prélèvement  
Figure 11 : le chromatogramme de 3<sup>ème</sup> échantillon 3<sup>ème</sup> prélèvement  
Figure 12 : le chromatogramme de 5<sup>ème</sup> échantillon 2<sup>ème</sup> prélèvement

## Liste des abréviations

- HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique.  
 $K_{oc}$  : coefficient de partage carbone organique/eau.  
 $K_{ow}$  : coefficient de partage octanol/eau.  
BCF : facteur de bioconcentration.  
PCBs : Polychlorobiphényles.  
 $\lambda_{max}$  : Longueur d'onde maximale.  
Pvt : prélèvement.  
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance).

# Investigation de l'efficacité de certaines techniques de bioremédiation de pollution par HAP

© Université Aboubekre Belkaid Tlemcen  
Département de Chimie  
Faculté des Science  
Tlemcen, 13000 ALGERIE  
Phone ----- • Fax -----

# Sommaire

Introduction Générale :.....	01
Synthèse Bibliographique : .....	05
1-1-Les hydrocarbures aromatiques polycycliques :.....	05
1-1.a Définition: .....	05
1-1.b. les Caractéristiques physico-chimiques : .....	08
1-1c. La toxicité des HAP : .....	10
1-1.d Origine et devenir des HAP :.....	11
*La solubilisation :.....	11
*La convection :.....	12
*L'adsorption : .....	12
*L'incorporation : .....	12
*La volatilisation : .....	12
*L'hydrolyse : .....	12
*La biodégradation :.....	12
1-2. La bioremédiation : .....	13
1-2.a principe : .....	13
1-2.b les techniques de la bioremédiation : .....	13
1-2.b.i La bioremédiation in-situ : .....	14
*La bioremédiation intrinsèque ou bio-atténuation : .....	14
*La biostimulation .....	14
*La bioaugmentation .....	14
*La bioinjection : .....	14
*La bioextraction :.....	14
*La biofiltration : .....	14
*La Phytoremédiation :.....	14

1-2.b.ii La bioremédiation sur ou hors-site : .....	15
L'épandage (landfill) : .....	15
Le compostage : .....	15
La biopile : .....	15
1-2.cTypes de bioremédiation : .....	15
1-2.ci Bioremédiation aérobie .....	15
1-2.c.ii Bioremédiation anaérobie .....	16
1-2.d Microorganismes dépolluants le sol .....	16
1-2.e Facteurs influençant la bioremédiation des sols pollués: .....	18
*granulométrie du sol : .....	18
Composition chimique des hydrocarbures : .....	18
*Humidité : .....	19
*Température : .....	19
«Salinité : .....	19
«Potentiel d'hydrogène (pH): .....	19
*Taux d'oxygène : .....	19
«Contenu en nutriments : .....	19
1-3.Conclusion : .....	20
Echantillonnage et méthodes d'analyse : .....	21
2-1.Echantillonnage : .....	21
2-1 .a Prélèvement de l'échantillon : .....	21
2-1.bprétraitement de l'échantillon : .....	21
2-1 .c Extraction des HAP : .....	22
Extraction par la méthode de soxhlet : .....	22
2-1.d Purification des HAP : .....	23
Remarque : .....	23
2-2Analyse des HAP: .....	23
2-2.a Principe de HPLC-UV : .....	23

2-2.b Appareillage de la HPLC-UV :.....	24
* Colonne : .....	24
*injecteur : .....	24
*détecteur UV .....	24
2-2.c Mode opératoire : .....	25
2-3Conclusion : .....	27
<b>Résultats et discussions : .....</b>	<b>28</b>
3-1 Résultats : .....	28
3-1-a Résultats de UV :.....	29
3-1-b Résultats de HPLC : .....	33
3-2 Discussions :.....	36
3-2-a Discussions des résultats de l'UV :.....	36
3-2-bDiscussions des résultats de la HPLC : .....	37
3-3Conclusion : .....	38
Conclusions Générale :.....	39

## Introduction Générale :

Ces dernières années la pollution pose un grand problème, les activités humaines ont engendré la production et l'extraction des composés chimiques, dont la plupart présentent une toxicité reconnue. C'est notamment le cas des métaux lourds, des solvants halogénés, des hydrocarbures ou des pesticides, pour ne citer que les plus couramment rencontrés. Malheureusement, ces activités anthropiques sont également responsables de la dissémination de ces composés dans l'environnement, augmentant les pollutions, et donc les risques pour les individus, mais aussi pour les écosystèmes.

Les hydrocarbures, et notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), sont une menace majeure pour l'environnement, à cause de leur caractère récalcitrant au sein des sols. En effet, les HAP sont classés comme des polluants organiques persistants, car ils possèdent un temps de rétention important dans l'environnement, lié à leur faible solubilisation dans les milieux aqueux et leur adsorption aux particules solides. De plus, de par leur caractère cancérigène et mutagène, ces molécules sont devenues une priorité pour les organisations de santé. Afin de préserver et de restaurer ces écosystèmes et d'éliminer ces polluants, il est donc nécessaire de développer des méthodes fiables et efficaces de dépollution.

Afin de diminuer cette pollution, des ont été développés. Ces techniques emploient des procédés mécaniques, physiques et chimiques afin d'éliminer les contaminations. Grâce à ces méthodes, les polluants sont immobilisés, extraits et détruits afin de réduire leurs impacts sur la santé et sur l'environnement. Cependant, ces procédés peuvent être très invasifs pour les écosystèmes traités car, d'une part, ils nécessitent souvent l'excavation des matériaux pollués ce qui bouleverse les environnements et, d'autre part, ils peuvent entraîner le rejet de composés toxiques pour les formes de vie. Il existe cependant d'autres techniques invasives permettant de limiter ces effets néfastes : la remédiation biologique. Cette approche utilise les capacités naturelles de certains organismes à dégrader les polluants parfois même jusqu'à leur minéralisation. Ce type de décontamination peut impliquer les végétaux (phytoremédiation) ou les microorganismes (bioremédiation). Même si la phytoremédiation est potentiellement efficace, elle semble toute fois limitée aux zones occupées par les racines contrairement aux procédés de bioremédiation utilisant les microorganismes qui ne sont pas limités dans l'espace. De plus, cette dégradation microbienne de la pollution peut aussi être améliorée soit par adjonction d'agents stimulant les microorganismes endogènes, soit par ajout de microorganismes

épurateurs endogènes ou exogènes. Ces procédés sont nommés respectivement biostimulation et bioaugmentation.

Dans ce mémoire on va appliquer quelques techniques de la bioremédiation concernant les sols on va se baser sur le procédé de biostimulation où on va ajouter des éléments au sol ou faire changer quelques paramètres telque la température pour activer les microorganismes dépolluants le sol.

Ce mémoire divisé on trois chapitres, le premier chapitre constitue la synthèse bibliographique, qui définir les hydrocarbures aromatiques polycycliques(HAP) et présente leurs caractéristiques physico-chimiques avec leurs effets sur les écosystèmes. D'un autre coté dans ce chapitre, on donne le principe de la bioremédiation avec une description de ses types et ses procédés. Le deuxième chapitre constitue les méthodes expérimentales, où on présente les différentes étapes qu'il faut les suivre pendant notre analyse avec une représentation de la méthode d'analyse utilisé et on ferme ce chapitre par le mode opératoire de l'expérience.

Enfin, on termine avec un troisième chapitre qui regroupe les résultats obtenus et la discussion de ces résultats.

## Synthèse Bibliographique :

À partir de ce chapitre on va donner une vue générale sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP, qui sont toxiques très contaminants pour l'environnement et de même pour les techniques de la bioremédiation et les types de cette dernière qui peut être soit aérobie soit anaérobie. D'un autre côté on va donner des exemples des microorganismes dépolluants les sols et les différents facteurs influençant sur la bioremédiation de ces derniers.

### 1-1-Les hydrocarbures aromatiques polycycliques :

#### 1-1.a Définition:

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques durables et qui se trouvent partout dans le monde, ils sont constitués d'au moins de deux cycles benzéniques, assemblés d'une façon linéaire, angulaire ou condensée (figure1).

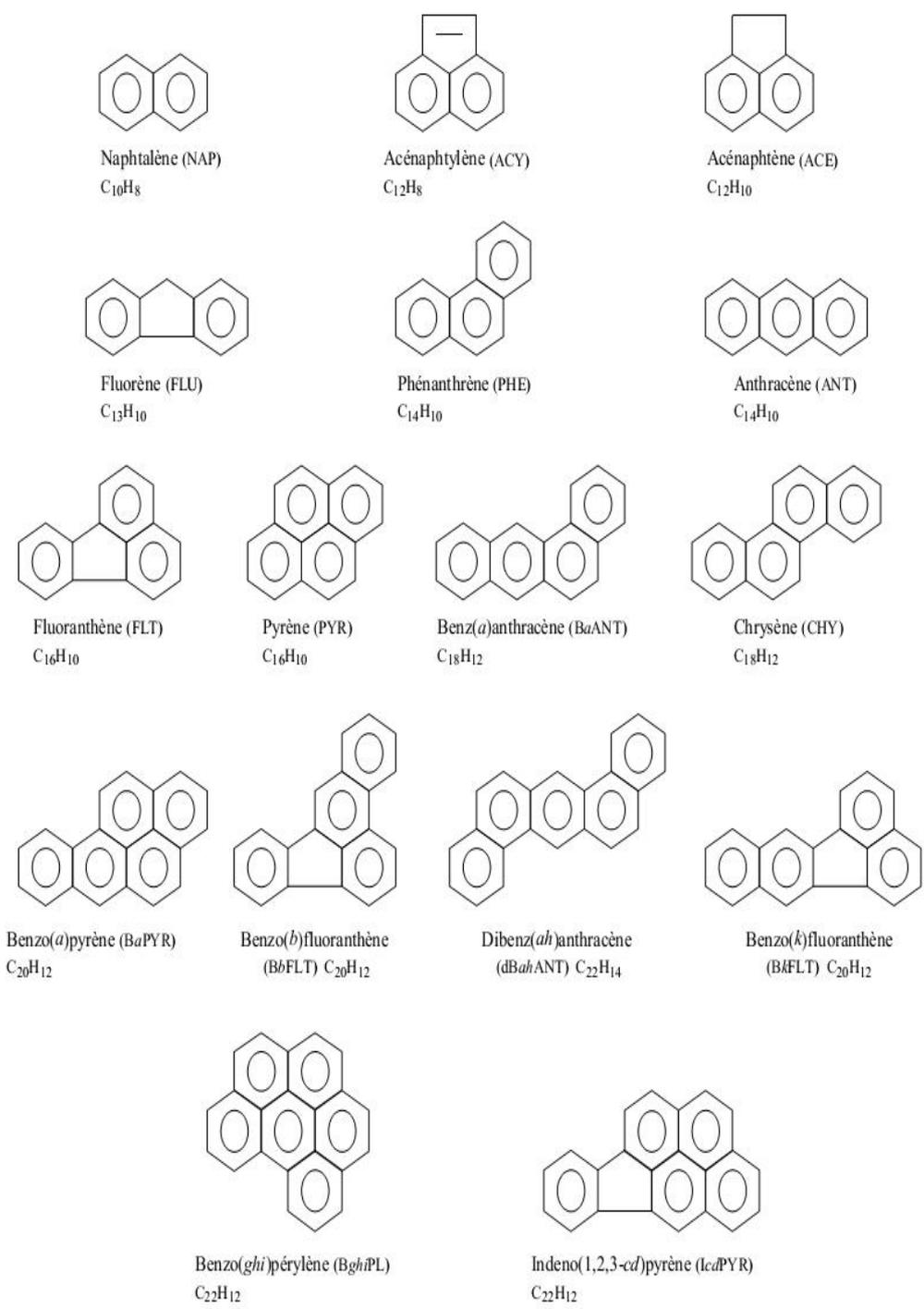


Figure 1 : Formules structurales des seize HAP prioritaires de la liste de l'EPA (Environmental Protection Agency, USA) (d'après Verschueren, 1996).

Les HAP sont émis dans l'environnement par trois processus : la diagenèse, la combustion et la pyrolyse de matières carbonées ou par biogenèse. Ces processus sont généralement regroupés en deux sources principales :

Les sources naturelles qui incluent les émissions liées aux feux de forêts, aux éruptions volcaniques, les réactions biogènes dans les plantes et les bactéries et les réactions géologiques associées à la production de fuel fossile et minéral.

SOURCES	HAP concernés
Combustibles fossiles	Acénaphthène, Anthracène (12g/kg de charbon), Benzo(a)pyrène, Benzo(k) fluoranthène, Chrysène, Dibenzo (a, h) anthracène, Fluorène, Indéno (1, 2,3-c, d) pyrène
Incendies	Acénaphthène, Benzo(a)pyrène, Indéno (1, 2,3-c, d) pyrène
Eruptions Volcaniques	Acénaphthène, Benzo(a)pyrène, Indéno (1, 2,3-c, d) pyrène
Synthèse naturelle	Benzo(a)pyrène (plantes, bactéries et algues), Indéno (1, 2,3-c, d) pyrène (feuilles d'arbres 26 à 234µg/kg, feuilles de tabac 18 à 38 µg/kg (HSDB, 2000), terreau 5µg/kg et fumier de cheval 50 µg/kg (Verschueren, 1996b))

Tableau 1: HAP émis par les différentes sources naturelles (LaurenceBOURCEREAU).

Les sources anthropiques qui sont majoritaires et regroupent aussi bien les processus de combustion de fuel fossile que les processus de transformation, tels que la production et l'utilisation de la créosote et la raffinerie du pétrole.

SOURCES	HAP concernés
Combustions incomplètes	Acénaphthène, Anthracène (échappements d'automobiles (0,02 à 6,45 µg/m <sup>3</sup> (OMS, 1998) ), Benzo(a)pyrène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(k) fluoranthène, Chrysène, Dibenzo (a, h) anthracène (quantité libérée dans l'atmosphère 8,3µg/km et de 0,33µg/km parcouru pour des automobiles munies et non munies d'un pot d'échappement catalytique (HSDB, 2001a)), Fluorène, Naphtalène, Phénanthrène, Pyrène
Raffinage du pétrole	Acénaphthène, Anthracène, Benzo(a)pyrène, Benzo(b) fluoranthène, Benzo(k) fluoranthène, Fluorène (2,4µg/m <sup>3</sup> en France (OMS, 1998), Indéno [1, 2,3-c, d] pyrène
Incinérateurs	Anthracène, Chrysène, Fluoranthène, Indéno [1, 2,3-c, d] pyrène
Revêtements routiers	Anthracène, Benzo(a)pyrène, Benzo(b) fluoranthène (10g/kg d'asphalte), Dibenzo (a, h) anthracène, Fluorène, Indéno [1, 2,3-c, d] pyrène (8g/kg de goudron), Pyrène

Charbon	Acénaphène, Anthracène, Benzo(a)pyrène, Benzo(b) fluoranthène, Benzo(k) fluoranthène, Naphtalène
Huiles	Benzo(a)pyrène, Benzo(k)fluoranthène, Dibenzo (a,h)anthracène, Fluorène, Phénanthrène, Pyrène

Tableau 2 : Les HAP émis par les différentes sources anthropiques (Laurence BOURCEREAU).

### 1-1.b. les Caractéristiques physico-chimiques :

Les HAP ont un caractère apolaire avec une très faible solubilité dans l'eau et une importante masse molaire. Le naphtalène est plus soluble ( $30000\mu\text{L}^{-1}$ ) que le phénanthrène ( $1290\mu\text{g.L}^{-1}$ ) dans l'eau pure et leur solubilisation est préférable par l'intermédiaire de solvants organiques telque l'acétone, le benzène et l'éthanol (Edwards et al. 1990). Ces composés sont non-ionisables donc le pH n'a aucun effet sur leur solubilité aqueuse par contre cette dernière est plus sensible à la température (Mackay et Shiu, 1977 ; Whitehouse et al. 1984). La solubilité du 1,2-benzoanthracène est assez sensible au changement de la salinité Whitehouse et al. (1984). Le composé qui a la plus grande pression de vapeur, il est le plus volatil. Il contribue fortement à l'odeur caractéristique des goudrons et peut être présent à des importantes teneurs dans l'air. Du fait de sa volatilité, le naphtalène est considéré comme un polluant atmosphérique (pression de vapeur de 6,5Pa). Des études montrent qu'un sol contaminé par un mélange de 14 HAP libère 20 à 30% du naphtalène alors que la volatilisation des HAP ayant plus de deux cycles aromatiques est négligeable.

Le caractère lipophile des HAP, exprimé à travers la valeur de leur coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ), est relativement important. Curtis et al. (1986) ont établi la relation linéaire suivante entre le paramètre d'adsorption  $K_{oc}$  et le  $K_{ow}$  des HAP:

$$\log K_{oc} = 0,92 \cdot \log K_{ow} - 0,23$$

La lipophilie des HAP est également responsable de leur bioaccumulation dans les organismes vivants. Cette accumulation est quantifiée par le facteur de bioconcentration (BCF) défini comme le rapport entre la concentration d'une substance à l'intérieur d'un organisme et sa concentration dans l'eau. Neelly et al. (1974) ont proposé la relation linéaire suivante entre le BCF et le  $K_{ow}$  des HAPs :

$$\text{BCF} = 0,542 \log Kow + 0,124$$

❖ Le tableau(1) regroupe les principales propriétés physico-chimiques des HAP.

HAP	Nombre de cycles	Masse molaire g.mol <sup>-1</sup>	Solubilité maximale µg.L <sup>-1</sup>	LogK <sub>ow</sub>	Température de fusion (°C)	Tension de vapeur (Pa) à 25°C	Constante de Henry atm.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup>
Naphtalène	2	128	30 000	3,37	80	6,5	4,8 10 <sup>-4</sup>
Acénaphthylène	3	152	3 930	4,07	96	3,9	1,1 10 <sup>-4</sup>
Acénaphthène	3	154	3 470	4,33	92	2,7	2,4 10 <sup>-4</sup>
Fluorène	3	166	1 980	4,18	216	1,7	1,7 10 <sup>-4</sup>
Phénanthrène	3	178	1 290	4,46	116	9,1 10 <sup>-2</sup>	8,6 10 <sup>-5</sup>
Anthracène	3	178	70	4,45	101	2,7 10 <sup>-2</sup>	3,9 10 <sup>-5</sup>
Fluoranthène	4	202	260	5,33	111	8 10 <sup>-4</sup>	3,5 10 <sup>-5</sup>
Pyrène	4	202	140	5,32	149	9,2 10 <sup>-5</sup>	5,1 10 <sup>-6</sup>
Benzo(a) Anthracène	4	228	14	5,61	255	6,7 10 <sup>-7</sup>	1,2 10 <sup>-6</sup>
Chrysène	4	228	2	5,61	158	8,4 10 <sup>-5</sup>	1,1 10 <sup>-6</sup>
Benzo(b) Fluoranthène	5	252	1.2	6,57	179	6,7 10 <sup>-5</sup>	1,2 10 <sup>-6</sup>
Benzo(k) Fluoranthène	5	252	0.6	6,84	167	6,7 10 <sup>-5</sup>	3,9 10 <sup>-6</sup>
Benzo(a)pyrène	5	252	3.8	6,04	217	6,7 10 <sup>-5</sup>	4,9 10 <sup>-6</sup>
Dibenzo (a, h) Anthracène	5	278	0.5	5,97	262	1,3 10 <sup>-8</sup>	7,3 10 <sup>-8</sup>
Indéno(c, d) Pyrène	6	276	0.3	7,66	222	1,3 10 <sup>-8</sup>	7 10 <sup>-8</sup>
Benzo(g,h,i) Pérylène	6	276	0.1	7,23	163	1,3 10 <sup>-8</sup>	5,3 10 <sup>-8</sup>

Tableau 3 :propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires (d'après Aziz & Melcer, 1991).

Donc les HAP sont des composés lipophiles et solubles dans plusieurs solvants organiques, ils sont aussi potentiellement bioaccumulés et concentrés dans les sédiments et les sols ainsi que les organismes.

La durée des HAPs augmente avec le nombre de cycles de la molécule. Par exemple, le naphtalène et l'acénaphthylène sont les composés de faible poids moléculaire, étant plus solubles et plus volatiles sont peu durants et donc peu bioaccumulables (Kanaly et Harayama, 2000). Par contre, les composés de poids moléculaires élevés sont très durants et par conséquent bioaccumulables.

Par exemple, la demi-vie dans les sols du benzo[k]fluoranthène est de plusieurs années, alors que celle du fluoranthène est de 1 à 2 mois. Le tableau suivant récapitule les demi-vies de plusieurs HAP dans les sols.

Nom	Sols Milieu Aérobie	Sols Milieu Anaérobie
	Domaine de variation (jours)	
Naphtalène	0,21-766	25-258
Acénaphtylène	42,5-60	170-240
Acénaphène	0,30-102	33-408
Fluorène	2-71	34-240
Phénanthrène	0,61-5475	2,6-800
Anthracène	2,72-2920	38,5-1840
Fluoranthène	44-6205	560-1760
Pyrène	3-6570	15,8-7600
Benzo(a) Anthracène	4-7220	270-2720
Chrysène	5,5-1900	180-4000
Benzo(b) Fluoranthène	113-9855	228-2120
Benzo(k) Fluoranthène	132-3175	1440-2440
Benzo(a)pyrène	2-9490	1444-3760
Dibenzo(ah) Anthracène	18-12940	3640-8560
Benzo(ghi) Pérylène	340-9125	2360-2600
Indéno(123cd) Pyrène	224-3130	2400-2920

Tableau 4 : Demi-vies des HAP par bioremédiation dans le sol (INERIS, 2005).

Les valeurs des demi-vies sont variables, mais dans tous les cas, pour les HAP de plus de quatre cycles ces valeurs augmentent considérablement (plus de 20 jours). Cependant les HAP de plus de cinq cycles peuvent être co-métabolisés (Juhász et Naidu, 2000 ; Kanaly et Harayama, 2000).

#### 1-1c. La toxicité des HAP :

De nos jours, les effets toxicologiques de tous les HAP sont mal connus. Les données expérimentales disponibles chez l'animal ont montré que certains HAP pouvaient conduire à de nombreux effets sur la santé, des effets systémiques (hépatiques, hématologiques, immunologiques et développement d'athéroscléroses), et des effets sur la reproduction comme des effets génotoxiques et cancérigènes.

Les tests de toxicité des HAP sont souvent effectués sur des animaux ou des micro-organismes, mais le problème qui se pose comment généraliser et mesurer cette toxicité pour les humains. Des tests d'écotoxicologie permettent de caractériser un niveau de toxicité des polluants présents dans les sols. Pour cela, il est possible de faire des tests sur les plantes ou sur les organismes du sol (bactéries, vers de terre) mais ils sont coûteux, longs et les micro-organismes doivent être au préalable adaptés aux polluants.

Une autre méthode consiste à réaliser des bio-essais sur les lixiviats du sol. Différents tests sont utilisés en laboratoire, mais pour les HAP le test le plus sensible et le plus rapide est le test Microtox (Renoux et al, 1999 ; Bispo et al, 1999) qui repose sur la disparition de luminescence de la bactérie *Vibrio fischeri*. Ce test permet de déterminer la concentration de polluant nécessaire pour diminuer la moitié de la luminescence initiale de la bactérie. La toxicité d'une molécule est différente lorsqu'elle est seule ou en mélange. Par exemple, la toxicité du fluorène est plus élevée lorsqu'il est en mélange avec du phénanthrène ce qui indique des effets d'association entre les molécules.

#### 1-1.d Origine et devenir des HAP :

Les HAP sont des composés résulte de la transformation de la matière organique d'origine végétale. Naturellement émis dans l'atmosphère lors d'explosions volcaniques, ou de feux de forêts, ils sont aussi contenus dans les combustibles fossiles comme le pétrole ou le charbon. Depuis le début des années industrielles, les HAP émis dans l'environnement sont généralement d'origine anthropogénique. Le transport, le chauffage résidentiel, le traitement des déchets par crémation émettent dans l'atmosphère des particules riches en HAP qui se dispersent avant de se déposer sur les sols lors d'épisodes de précipitations. D'autre part, l'exploitation des gisements de pétrole et de charbon, le raffinage, le stockage et les rejets accidentels ou incontrôlés (marées noires) sont sources de pollution des sols et des milieux marins par les HAP. Certains HAP comme le naphthalène ou le phénanthrène, se retrouvent dans des pesticides, fongicides, détergents ou colorants, et entrent dans l'environnement lors d'activités agricoles ou industrielles (Doyle et al, 2008; Jouanneau et al, 1999). Les HAP sont donc des composés ubiquitaires qui contaminent l'air, les eaux douces ou marines, les sédiments et les sols, à des concentrations variables.

Suivant leur exposition, les sols peuvent contenir moins d'un centième de ppm de HAP dans les zones dites 'non contaminées' mais des milliers de ppm sur des sites industriels (Cerniglia, 1992). Les HAP adsorbés aux particules de sol ou associés à la matière organique sont peu mobiles, et sont difficilement dégradables par les microorganismes s'ils sont en suspension.

Le transport des HAP dans les différentes phases de sols fait principalement intervenir les phénomènes suivants :

#### \* La solubilisation :

Le partage du polluant entre la phase organique et la phase aqueuse du sol est contrôlé par sa solubilité dans l'eau. Cette caractéristique a une grande influence sur la mobilité des polluants dans les sols (McCray et al, 2001).

\* **La convection :**

Elle dépend de mouvement des molécules organiques les plus facilement solubles par la phase aqueuse mobile. Ce mécanisme dépend notamment des caractéristiques géotechniques du milieu filtrant (McCray et Dugan, 2002), il est possible aussi d'entraîner ces polluants par des particules fines.

\* **L'adsorption :**

L'adsorption c'est un phénomène dynamique de partition d'un soluté d'une phase liquide vers une phase solide constituée par l'ensemble des particules solides du sol. Lorsque la concentration de matière organique dans les sols est supérieure à 1%, l'adsorption est très couramment décrite comme un simple équilibre de partage du composé organique entre la phase aqueuse et la matière organique du sol (Karichhoff et al, 1979, Chiou et al, 1986 ; Chiou, 1989). Ce phénomène fait intervenir des autres phénomènes très complexes résultant à plusieurs types de liaisons adsorbant/polluant (Calvet et al, 1989).

\* **La diffusion :**

C'est un phénomène physique lié à l'agitation moléculaire où il y a un gradient de concentration et les molécules en mouvement se déplaceront de la zone la plus concentrée vers la moins concentrée. La diffusion est le mécanisme de transport le plus important dans les zones à faible perméabilité que ce soit à l'échelle macroscopique, dans le cas des argiles par exemple, ou à l'échelle microscopique, dans les agrégats poreux et au sein des particules. Les zones à faible perméabilité qui ont accumulé des polluants organiques sur de longues périodes peuvent se conduire à des sources secondaires de polluants (Lee et al, 1992).

\* **L'incorporation :**

Elle consiste en l'emprisonnement physique des molécules polluantes diffusant dans le sol et plus précisément au sein de la matière organique naturelle poreuse. La diffusion au sein de la matière organique du sol est le second mécanisme qui influe sur le comportement des polluants organiques dans les sols au cours du temps (Farrel et Reinhard, 1994).

\* **La volatilisation :**

Elle concerne essentiellement les composés organiques volatils. Ce phénomène dépend principalement de la constante de Henry, qui est de même une fonction de la température (Khalil HANNA, 2004).

\* **L'hydrolyse :**

C'est un processus de dégradation des molécules par l'action de l'eau, il est fortement influencée par le pH et la température du sol (Khalil HANNA, 2004).

\* **La biodégradation :**

Elle caractérise la décomposition des molécules organiques par les micro-organismes présents dans le sol. Elle dépend principalement de la présence suffisante de micro-organismes adaptés, de la température, et de la quantité

d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons telque les nitrates et les  $Fe^{3+}$  dans le sol (Stegmann et al, 2001).

- ❖ Le schéma suivant présente ces phénomènes de transport des HAP dans les différentes phases de sols.

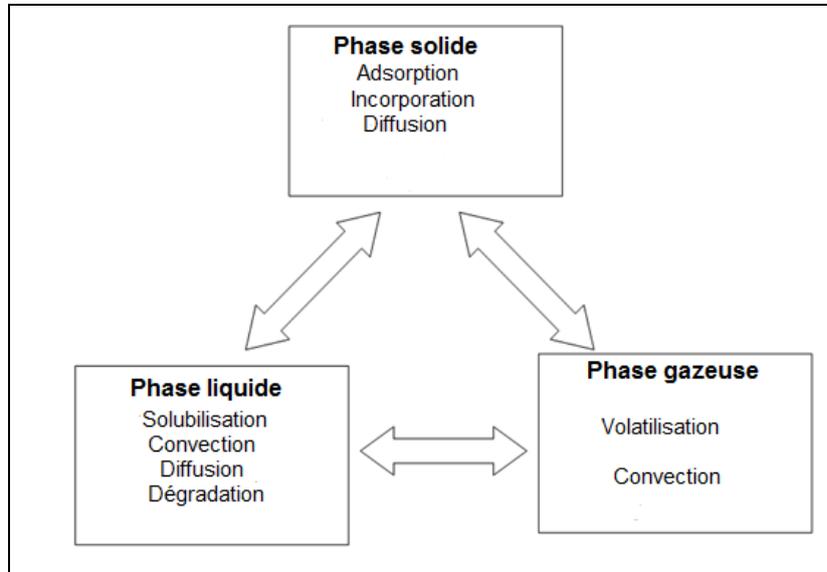


Figure2 : les phénomènes contrôlant le devenir des polluants dans les différentes phases de sols (Mahjoub et al, 1999).

## 1-2. La bioremédiation :

### 1-2.a principe:

La bioremédiation est une méthode baser sur l'activité de la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes, généralement sont soit des bactéries, des micros algues ou des champignons, dégradants les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être déjà présents dans la zone polluée (indigènes) ou ajoutés au milieu (exogène), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol. La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie, toutefois l'application des systèmes de bioremédiation en condition d'anaérobie permet de dégrader un certain nombre de molécules récalcitrantes (Chedly ABDELLY, 2006).

### 1-2.b les techniques de la bioremédiation :

Ils existent des traitements de bioremédiation in-situ et d'autres sur ou hors-situ.

### 1-2.b.i La bioremédiation in-situ :

Il s'agit de traitements biologiques directement appliqués sur le site à dépolluer. Ils ont l'avantage de ne pas nécessiter d'excavation et de permettre, éventuellement, la poursuite des activités.

#### \* La bioremédiation intrinsèque ou bio-atténuation :

C'est simplement la biodégradation naturelle des polluants par les micro-organismes présents dans le sol ou la nappe. Cette méthode consiste uniquement à vérifier la présence et la capacité des micro-organismes utilisés pour dégrader les polluants (khalil hanna, 2004).

#### \* La biostimulation :

Cette technique consiste à remonter l'activité des populations microbiennes présentes dans le sol ou dans les eaux souterraines par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu qui sont le potentiel d'oxydo-réduction, l'humidité et la température (khalil hanna, 2004).

#### \* La bioaugmentation :

Cette technique est utilisée lorsque l'activité des microorganismes indigènes est insuffisante. Il s'agit d'ajouter des micro-organismes étrangers spécialisés. Une des voies de recherche actuelle est l'utilisation de micro-organismes génétiquement modifiés pour la dégradation des polluants récalcitrants (Khalil hanna, 2004).

#### \* La bioinjection :

C'est la fragmentation des grosses molécules par le couplage de l'injection d'air ou d'oxygène à l'activité biologique normale des micro-organismes suivi d'un entraînement par le flux gazeux (Khalil hanna, 2004).

#### \* La bioextraction :

Elle suit le même chemin sauf que c'est un couplage de l'activité biologique des micro-organismes et de l'extraction sous vide des polluants (khalil hanna, 2004).

#### \* La biofiltration :

Ce traitement consiste à utiliser des microorganismes pour dégrader les polluants contenus dans l'air à traiter : l'air contaminé est mise en contact avec une phase aqueuse dans laquelle se développe la population microbienne, connue aussi sous le nom de la biomasse. Dans une unité de biofiltration, l'air à dépolluer traverse d'abord un filtre et un humidificateur afin de supprimer les poussières et graisses présentes dans le gaz et d'amener le niveau d'humidité à 100%. L'air est ensuite introduit dans une cuve contenant un garnissage formé de matériaux très poreux. A la surface des particules qui constituent le garnissage se trouve un biofilm qui correspond à une pellicule d'eau contenant des microorganismes dont la fonction est de dégrader les polluants présents dans l'air à traiter (khalil hanna, 2004).

#### \* La Phytoremédiation :

C'est l'utilisation de certaines plantes qui favorisent la migration des polluants (métaux lourds) par l'intermédiaire de leur système racinaire. L'efficacité de cette technique en vue d'extraire les polluants organiques est peu étudiée (khalil hanna, 2004).

## 1-2.b.ii La bioremédiation sur ou hors-site :

La biodégradation en tas (land-farming) est utilisée sur site et peut être formellement séparée en trois techniques : l'épandage, le compostage et la biopile ( Khalil hanna, 2004).

### \* L'épandage (landfill) :

C'est une méthode très ancienne qui consiste à étaler en couche très fine le sol pollué de manière à favoriser son aération naturelle. Le principal problème qui se pose est de contrôler les migrations possibles des polluants dans le sol support (Khalil hanna, 2004).

### \* Le compostage :

Il consiste à mélanger le sol pollué avec des matériaux organiques frais. L'élévation de température et l'accroissement de la diversité microbienne favorise la biodégradation des polluants (khalil hanna, 2004).

### \* La biopile :

C'est un compostage élaboré où tous les paramètres biologiques et physico-chimiques sont parfaitement contrôlés. Les matières à traiter sont empilées dans un ordre précis jusqu'à 2 à 4 m de hauteur. L'intercalation de drains, permet l'aération du milieu, si l'on souhaite faire une dégradation aérobie. La technologie de biodégradation en tas (piles) est utilisée pour la décontamination de sols pollués aux hydrocarbures légers (essence, diesel, huile à chauffage, mazout léger, huiles usées). Les facteurs limitant l'application de cette technologie sont :

- La perméabilité du sol.
- Le caractère réfractaire de certains contaminants à la biodégradation (PCBs, dioxines, et autres hydrocarbures chlorés).
- La présence de substances toxiques en concentration élevée dans le sol (cuivre, plomb, mercure...) (khalil hanna, 2004).

## 1-2.c Types de bioremédiation:

### 1-2.c.i Bioremédiation aérobie :

Selon ZHENPENG et al.,(2002), la bioremédiation aérobie d'une substance organique telque les HAP est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes. Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants :

- Vitesse de dégradation des composés organiques.
- Quantité de l'oxygène consommée.
- Produits résultant de la dégradation.
- Activité microbienne.

- ❖ Le schéma suivant figure les processus de bioremédiation d'une substance organique en conditions aérobies :

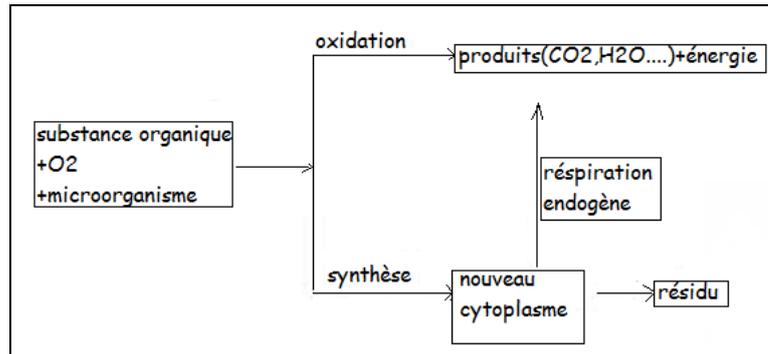


Figure3 : Dégradation aérobie de la matière organique ZHENPENG et al., (2002).

### 1-2.c.ii Bioremédiation anaérobie :

La bioremédiation anaérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en conditions d'anaérobiose.

- ❖ Le schéma suivant figure les processus de biodégradation que subit la matière organique en conditions anaérobies.

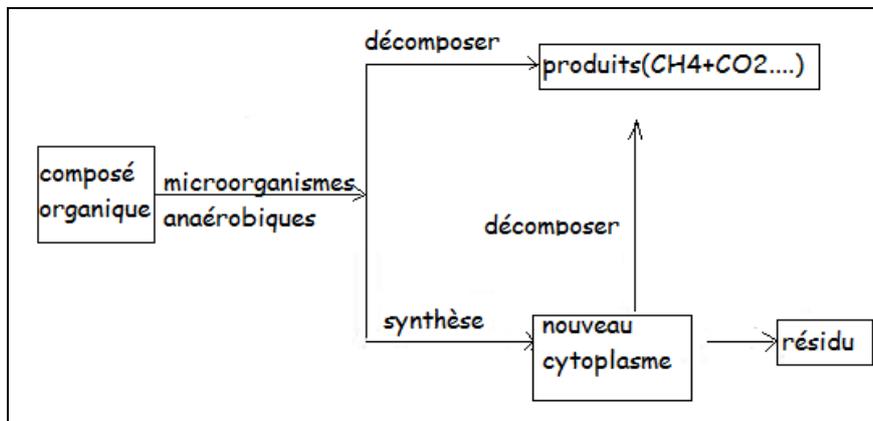


Figure 3: Dégradation anaérobie de la matière organique (HONGWEI et al, 2003).

### 1-2.d Microorganismes dépolluants le sol :

Le sol est composé de matière minérale provenant de l'érosion des roches et de matières organiques. Les microorganismes sont des êtres vivants microscopiques généralement unicellulaires qui multiplient naturellement dans tous les milieux et dans des conditions très variables (BOUSSSEBOUA, 2002). Le sol comprend des

bactéries, des champignons, des protozoaires, des algues et des virus (SOLTANI, 2004).

La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement sur les bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de les dégrader (Klug et Markovetz, 1971; Blasig et al., 1984; Davies et Westlake, 1979; Fedorak et al., 1984; Meulenbergh et al., 1997; Yamada-Onodera et al., 2002). Une grande diversité de bactéries et champignons peut dégrader les polluants organiques dans le sol, tels que les HAP qui peuvent être devenus des nouvelles sources de carbone dans le sol.

Les HAP sont riches en carbone, ils sont donc la source d'énergie des microorganismes. Le développement rapide des microorganismes entraîne une consommation rapide des nutriments. Plus le carbone est consommé, plus la concentration du contaminant diminue, puis le milieu permet à d'autres contaminants de se désorber jusqu'à l'atteinte de la dépollution.

Les microorganismes dépolluants des sols sont activés par l'ajout de quelques éléments comme l'azote et le phosphore ou par l'augmentation de la température plus que 25°C.

- ❖ Le tableau suivant présente quelques exemples de genres microbiens incluant des microorganismes agissant dans la bioremédiation des hydrocarbures :

Bactéries		Champignons
Gram -	Gram +	
Pseudomonas	Micrococcus	Aspergillus
Xanthomonas	Arthrobacter	Penicillium
Acinetobacter	Rhodococcus	Acremonium
Flavobacterium		Fusarium
Agrobacterium		Trichoderma

Tableau 5: Exemples de microorganismes dépollueurs (BOUDERHEM Amel, 2011).

Parmi les microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures, les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser ces substrats (BERTRAND et MILLE, 1989). On peut retrouver tous les types de bactéries, des autochtones, des hétérotrophes, des aérobies ; des anaérobies ; des mésophiles ; des psychrophiles et des thermophiles (ZHENPENG et al., 2002).

Plusieurs hypothèses sur l'origine des bactéries dans le sous sol sont émises:

- Migration depuis la surface soit par un processus naturel géologique soit par les opérations de forage.
- Migration latérale ou verticale avec l'eau de surface via les infiltrations, les flux hydrodynamiques et les mouvements d'eau profonde.
- Capture dans les sédiments lors de leur formation (LENAITRE et al., 1998).

Un sol qui contient des hydrocarbures modifie l'activité des microorganismes (CHAIANEU et al. 1995). Les bactéries et les 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 bioremédiation 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, les hydrocarbures se lient partiellement à la matière organique du sol et deviennent alors moins accessibles aux microorganismes donc seule une partie des polluants est dégradée.

### 1-2.e Facteurs influençant la bioremédiation des sols pollués:

Les principaux paramètres influents sur l'efficacité de la bioremédiation sont :

\* **Granulométrie du sol :**

La présence d'argile dans le sol rend le milieu peu propice à la mobilité des molécules, les argiles étant peu perméables à l'eau. Ces dernières présentent une plus grande surface disponible que les sables, ce qui favorise l'adsorption des particules et limite la diffusion du contaminant. Les pores du sol piègent les particules de polluant, les rendant ainsi immobiles et non disponibles pour les microorganismes et les plantes. Les argiles sont constituées de fines particules et présentent de nombreuses micro surfaces qui facilitent l'adsorption. Ces particules adsorbées ne sont pas en contact avec les bactéries (Frick et al. 2000). À l'opposé, les sols ayant une granulométrie élevée présentent une plus faible adsorption, rendant les contaminants plus biodisponibles (Frick et al. 2000). Les sols à granulométrie élevée comme les sables favorisent la minéralisation des HAP en raison de la meilleure disponibilité des polluants pour les microorganismes (Frick et al. 2000).

❖ Le tableau suivant montre bien la relation entre la surface disponible, la porosité pour les contaminants et l'adsorption.

Type de sol	Porosité (%)	Perméabilité (m/sec)	Potentiel d'adsorption
Argile	40-70%	$10^{-9}$ à $10^{-13}$	Élevé ↓ Faible
Silt	35-50%	$10^{-5}$ à $10^{-18}$	
Sable	25-50%	$10^{-2}$ à $10^{-6}$	
Gravier	25-40%	$10^0$ à $10^{-3}$	

Tableau 6 : Porosité, perméabilité et potentiel d'adsorption (Landry et Mercier, 1983).

\* **Composition chimique des hydrocarbures:**

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 légères,

les aromatiques à haut poids moléculaire(HAP) et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible (SOLTANI, 2004).

\* **Humidité :**

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 bioremédiation (DAVIS et MADSEN, 1996) . Inversement, des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz et générer des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie (BALLERINI, 1999).

\* **Température :**

La température du sol où l'activité microbienne est à son maximum se situe entre 20 et 37°C (SCRIBAN et al, 1999;GIBBS et al, 2001. Les expériences montrent qu'à une température élevée la bioremédiation est plus rapide. Les températures optimales de la croissance et de l'activité des réactions chimiques des microorganismes du sol varient selon la nature de l'espèce.

\* **Salinité :**

La salinité diminue le nombre des microorganismes dans le sol. Elle ralentit les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO<sub>2</sub> (MALLOUHI, 1989). Donc les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la bioremédiation (MALLOUHI, 1989).

\* **Potentiel d'hydrogène (pH):**

L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Il doit être situé entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7 (GABET, 2004). Si le pH est acide, il peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont très toxiques pour les bactéries (ABUL-KASSIM et SIMONIETE, 2001).

\* **Taux d'oxygène :**

Le processus biologique aérobie est souhaitable pour la bioremédiation de sol pollué par le diesel (BRINKMANN et al., 1998) . Ainsi, la respiration aérobie semble être le mécanisme primaire pour la bioremédiation des hydrocarbures(GREER et al, 2003) . Les sols à forte porosité sont plus riches en oxygène. La présence d'oxygène est à son maximum près de la surface dans la zone non saturée en eau. Plus on descend vers la zone inférieure, plus la concentration en oxygène est faible et dépend de la présence d'un réseau racinaire facilitant la pénétration de l'air. C'est-à-dire on fait appel au phénomène de la rhizosphère. C'est un phénomène de libération d'oxygène est plus important chez les plantes aquatiques, cela leur permet de survivre dans la zone saturée en eau normalement plus pauvre en oxygène.

Plusieurs auteurs montrent que la bioremédiation anaérobie est plus lente que la bioremédiation aérobie (HUANG et al., 2000) .

\* **Contenu en nutriments :**

Les microorganismes et les plantes sont au cœur du processus de bioremédiation. Ils doivent trouver dans un site contaminé les éléments essentiels à leur croissance. Les HAP sont riches en carbone, ils sont donc la source d'énergie des microorganismes. La concentration du contaminant et sa biodisponibilité

déterminent la quantité de nourriture disponible. Cette dernière est généralement élevée au début du traitement, mais baisse au fur et à mesure que la dégradation s'effectue et que les substances se minéralisent. Les plantes consomment aussi très rapidement les éléments comme le phosphore ou l'azote essentiels à leur développement. La quantité de phosphore et d'azote disponible doit être surveillée. L'utilisation d'un compost municipal comme nutriment s'est avérée très efficace pour maintenir l'activité des microorganismes. Le développement rapide des microorganismes entraîne une consommation rapide des nutriments. Plus le carbone est consommé, plus la concentration du contaminant diminue, puis le milieu permet à d'autres contaminants de se désorber jusqu'à l'atteinte de la décontamination. En même temps que les microbes consomment l'énergie (carbone) provenant du contaminant les concentrations de phosphore et d'azote diminuent dans l'environnement. L'azote est mobilisé pour le développement de la population microbienne. Le sol contient généralement peu d'azote et de phosphore, on doit donc en ajouter selon les besoins (Miller and al. 2004).

### 1-3.Conclusion :

On a étudié théoriquement qu'-es ce que donne la bibliographie sur les HAP et leur bioremédiation, donc pour bien signaler cette étude il nous faut l'application expérimentale qui va charger le deuxième chapitre.

## Echantillonnage et méthodes d'analyse :

Dans ce chapitre on va commencer par l'échantillonnage qui est très important, où il faut bien prélever, prétraiter l'échantillon et bien adapter l'étape de l'extraction des HAP, puis on passe à l'analyse des extraits obtenus.

### 2-1.Echantillonnage :

#### 2-1.a Prélèvement de l'échantillon :

Les échantillons du sol sont prélevés à partir de 20 cm à 40 cm de profondeur à l'aide d'une spatule sèche et chaque échantillon conservé dans un flacon sèche en verre brun. En suite les échantillons sont tamisés pour éliminer les éléments grossiers et les débris organiques. En attendant les analyses, les échantillons de sols sont conservés à l'abri de la lumière à une température environ 4°C pour éviter le stress hydrique qui peut perturber les mesures biologiques (CHAUSSOD et al, 1992 ; FARDOUX et al, 2000) ou ne pas passer 4 jours de stockage.

#### 2-1.bprétraitement de l'échantillon :

Au laboratoire l'échantillon est divisé en cinq parties, une est resté à sa nature mais pour les autres, on les polluer par le diesel avec la présence des bactéries et de nutriment NPK. A des périodes successives chaque partie est passée par les étapes d'analyse.

#### 2-1.c Extraction des HAP :

L'extraction est considérée comme l'étape la plus délicate lors de la préparation de l'échantillon, elle permet d'isoler les composés à étudier de la matrice de prélèvement et de les transférer dans un solvant approprié à la technique d'analyse (BRICE TEMIME-ROUSSEL,2002).

Ils existent plusieurs méthodes d'extraction mais le choix de la méthode revient à la nature des composés à étudier. Parmi les méthodes les plus connus on note :

- Extraction par la méthode de soxhlet.
- Extraction par l'agitation mécanique.
- Extraction par ultrasons.
- Extraction accélérée par solvant à haute température sous pression.
- Extraction assistée par micro-ondes.
- Extraction par fluide supercritiques. (R.Jeannot, B.Lemière, S.Chiron et F.Augustin, D.Darmendrail, 2000).

Parmi toutes ces méthodes, la méthode de référence concernant les HAP, c'est la méthode de soxhlet.

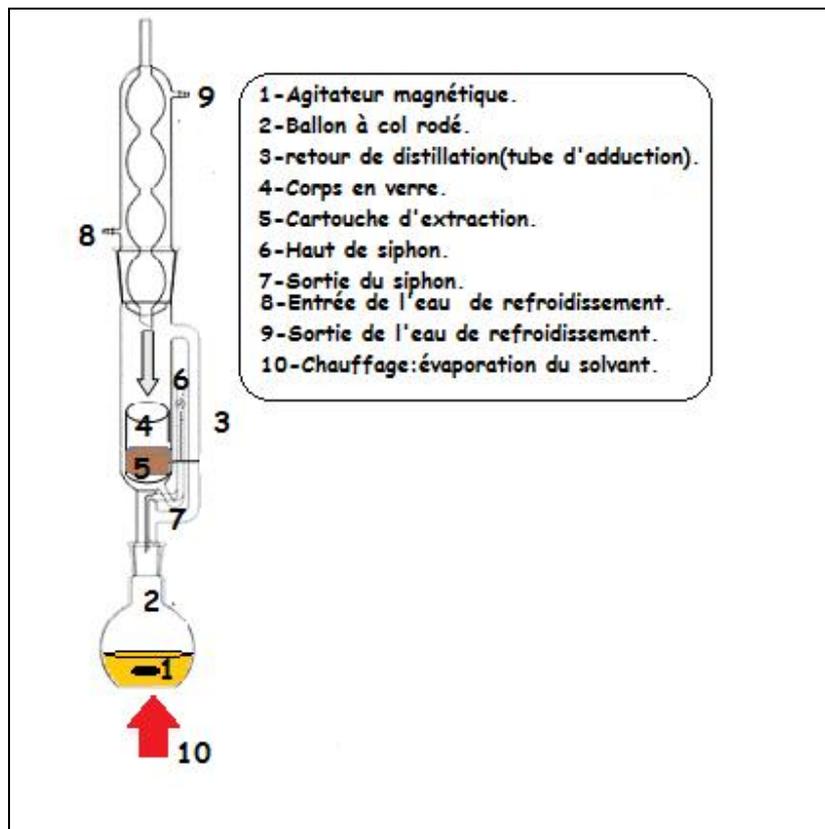
### Extraction par la méthode de soxhlet :

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide-liquide.

Le solvant est de 5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire, il est porté à ébullition, puis condensé avec le condenseur à boules, dans le réservoir à siphon, contenant le solide à extraire dans une cartouche de papier épais. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation de solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois, selon la facilité avec laquelle le produit diffuse dans le solvant.

Le problème de cette méthode est le temps d'extraction qui est entre 4 à 24 heures. Le solvant peut utiliser pour l'extraction des sols pollués est généralement : le dichlorométhane.

- ❖ La figure suivante représente les différents constituants d'un extracteur soxhlet et comment se passe l'extraction.



**Figure 4: Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet (BR ICE TEMIME-ROUSSEL, 2002).**

### 2-1.d Purification des HAP :

La purification, étape suivant l'extraction a pour objectif d'éliminer les substances coextraites avec les polluants qui peuvent interférer lors de l'analyse instrumentale.

Cette étape dépend de la nature du polluant recherché et celle des constituants d'échantillon coextraits. On pratique généralement la chromatographie d'adsorption sur alumine, florasil ou silice, si on prend en considération la taille des molécules en fait appel à la chromatographie de perméation de gel. Mais la plus préférée pour les HAP, c'est la chromatographie d'adsorption sur la silice (R.Jeannot, B.Lemière, S.Chiron et F.Augustin, D.Darmendrail ,2001).

#### Remarque :

Après la purification on pose l'extrait dans un évaporateur rotatif pour diminuer la concentration de dichlorométhane jusqu'on arrive à un volume de 2ml.

Les opérations de purification sont suivies d'une concentration des extraits par évaporation du solvant sous flux d'azote.

### 2-2Analyse des HAP:

Plusieurs méthodes couplées sont couramment utilisées pour l'analyse quantitative et qualitative des HAP. On peut distinguer les méthodes basées sur la séparation des HAP en phase liquide (chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV (HPLC-UV), ou couplée à un fluorimètre (HPLC-FLUO)) de celles basées sur la séparation des HAP en phase gazeuse (chromatographie gazeuse couplée à un détecteur spectromètre de masse (GC-MS) ou à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)). D'autres techniques de couplage, telles que la spectrométrie de masse (simple ou en tandem) couplée à la chromatographie liquide ou la spectrométrie de masse en tandem, couplée à la chromatographie en phase gazeuse, sont apparues plus récemment et peuvent permettre d'améliorer l'identification et la quantification de HAP dans des matrices environnementales très complexes( BRICE TEMIME-ROUSSEL,2002). Pour notre analyse on va utiliser comme méthode la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV (HPLC-UV).

#### 2-2.a Principe de HPLC-UV :

La HPLC est une technique de séparation analytique et préparative des molécules d'un composé, ou un mélange de composés. En effet, le mélange à séparer est poussé par un fluide à haute pression appelé phase mobile, dans une colonne remplie d'une phase stationnaire. Dans cette phase les constituants du mélange se déplacent moins vite que la phase mobile, ils seront donc séparés par leur vitesse d'élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé de pics appelé chromatogramme. L'amplitude de ces pics et leur aire permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté (Laurence BOURCEREAU).

## 2-2.b Appareillage de la HPLC-UV :

La HPLC-UV est composée de :

### \* Colonne :

Les colonnes analytiques les plus utilisées contiennent une phase inverse de type silice greffée avec des groupements alkyl C-18, de longueur 15-25 cm et de diamètre interne de 4 à 5 mm. ( R.Jeannot,B.Lemière,S.Chiron et F.Augustin,D.Darmendrail,2000).

### \* Injecteur :

L'injecteur universel est la vanne d'injection à six entrées qui permet l'injection de volumes reproductibles sans arrêter le débit de la phase mobile. Le volume d'injection est de 10 à 100  $\mu\text{l}$ .( R.Jeannot,B.Lemière,S.Chiron et F.Augustin,D.Darmendrail,2000).

### \* Détecteur UV :

Le détecteur UV à barrette de diode fournit en plus le spectre d'absorption de chaque composé. Les spectres des composés obtenus en temps réel et leur rapprochement avec les spectres disponibles en bibliothèque permettent l'identification des composés. Toutefois, les limites de détection atteintes par ce type de détecteur restent du même ordre de grandeur que le détecteur UV (R.Jeannot, B.Lemière, S.Chiron et F.Augustin, D.Darmendrail, 2000).

❖ Le schéma suivant figure l'appareillage principal de la HPLC :

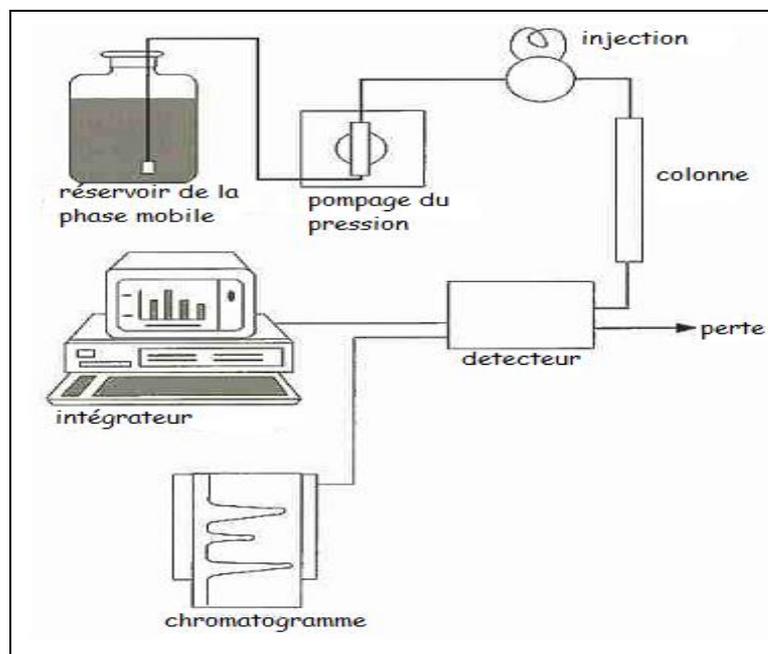


Figure 5:Appareillage de HPLC-UV (F. Chaspoul).

## 2-2.c Mode opératoire :

### \* Préparation de l'échantillon :

On a pris une grande quantité de sol, puis on a le divisé dans trois bacs:

-le premier bac contient 910g de sol+100ml d'eau.

-le deuxième bac contient 910g de sol+100ml d'eau+100g de diesel.

-le troisième bac contient 910g de sol+100ml d'eau+100g de diesel+250ml de bactérieF10.

-Le quatrième bac contient 910g de sol+100ml d'eau +100g de diesel+100ml NPK.

-Le cinquième bac contient 910g de sol+100ml d'eau+100g de diesel+250ml de bactérieF10+100ml NPK.

-Le sixième échantillon c'est le diesel.

### \* Prélèvement de l'échantillon :

1<sup>er</sup> prélèvement :22-06-2013.

2<sup>ème</sup> prélèvement :26-06-2013.

3<sup>ème</sup> prélèvement :30-06-2013.

### Remarque :

Pour la préparation des bactériesF10, on a pris 200g de bactérie dans 2l d'eau et on a laissé reposer une durée de 2 heures avec un mélange périodique.

Pour la préparation de NPK (40/40/40), on a pris 5g de NPK +2l d'eau non chloré (sans javel).

❖ Pour l'analyse on suit les étapes suivantes :

### \* Préparation des étalons :

Préparer un minimum de 3 solutions étalons des concentrations (0,05 ;0,025 ;0,0025 µg/ml) par dilution appropriée de la solution mère d'une concentration de( 5µg/ml) dans l'acétonitrile à l'aide de micropipettes et de ballons jaugés.

\* Extraction Soxhlet :

-Dans la colonne de soxhlet, on pose un coton décontaminé par l'acétone, puis on ajoute 20g de mélange (sol/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 10/10) et on pose au nouveau le coton sur le mélange.

-Dans le ballon on remplit 250 ml de dichlorométhane.

-on a fixé le dispositif et on a commencé à chauffer jusqu'au 45°C.

Pour chaque échantillon on fait arrêter l'extraction à 25 cycles.

-lorsqu'on a terminé l'extraction on a fait évaporer le solvant dans un rota vapeur jusqu'on arrive à environ 2ml.

\* Extraction des HAP à partir de diesel :

Dans une ampoule à décanter, on a rempli 100ml de dichlorométhane+100ml de  $\text{H}_2\text{O}$ +50ml de diesel et on a laissé décanter pendant 16 heures, en fin on a récupéré la phase organique et on a évaporé cette dernière dans le rota vapeur.

\* Purification :

On fait glisser un petit coton jusqu'à l'extrémité d'une colonne de purification. Remplir la colonne de purification avec 5 g d'alumine désactivée (dans l'étuve à 150°C) puis avec 1 cm de sulfate de sodium anhydre. Rincer la colonne avec environ 10ml de cyclohexane. Lorsque le ménisque du solvant affleure la surface du sulfate de sodium, ajouter l'extrait. Rincer le tube ayant contenu l'extrait et transférer sur la colonne. Eluer avec 40 ml de cyclohexane. Concentrer l'extrait purifié dans le rota vapeur jusqu'à  $\pm 0.5\text{ml}$ .

\* Analyse par chromatographie (HPLC) :

Remarque :

Avant de passer à la HPLC on a fait passer les extraits dans le détecteur UV.

Les conditions chromatographiques sont :

-Phase mobile : acétonitrile/méthanol :

- 40/60 pendant 2 minutes.
- 100/0 pendant 10 minutes.
- 100/0 pendant 30 minutes.
- 40/60 pendant 31 minutes.

-Volume injecté : 20  $\mu$ l.

-Débit : 1 ml/min.

-Température : 25-26 °C.

- Après le règlement de ces paramètres, on doit rincer la colonne avec l'éthanol ou le méthanol puis on passe au l'étalonnage pour avoir la courbe d'étalonnage. après cette dernière étape on passe à l'analyse de l'échantillon où on injecte 20  $\mu$ L d'échantillon et on fin on fait la comparaison entre la courbe d'étalonnage et celle d'échantillon analysé.

Remarque :

Pour le détecteur UV on a fait passer tout les extraits mais dans la HPLC, on a fait passer les extraits suivants (2,2b, 3b ; 2c).

**2-3 Conclusion :**

Dans cette partie on a bien arrivé à appliquer l'extraction et on a fait le plus possible pour ne pas rater les HAP pendant les différentes étapes.

La HPLC donne des résultats et le détecteur UV donne des résultats dans le dernier chapitre on va discuter ces résultats.

## Résultats et discussions :

Dans cette partie on va donner les résultats obtenus et on va les discuter.

### 3-1 Résultats :

Le tableau 8 représente les la détection des HAP dans chaque échantillon, on se basant sur le tableau référence suivant :

HAP	$\lambda_{\max}$ d'absorption des UV ( nm)
Naphtalène	220
Acénaphtylène	229
Acénaphène	229
Fluorène	261
Phénanthrène	251
Anthracène	252
Fluoranthène	236
Pyrène	240
Benz[a]anthracène	287
Chrysène	267
Benzo[b]fluoranthène	256
Benzo[k]fluoranthène	307
Benzo[a]pyrène	296
Benzo [ghi] pérylène	300
Dibenz [a,h]anthracène	297
Indéno [1,2,3-cd]pyrène	250

Tableau 7 : référence des longueurs d'ondes max (Directeur Général d'AFNOR le 20 février 2004 pour prendre effet le 20 mars 2004).

### 3-1-b Ré3-1-a Résultats d'UV :

HAP échantillons	1 <sup>er</sup> échantillon			2 <sup>ème</sup> échantillon			3 <sup>ème</sup> échantillon			4 <sup>ème</sup> échantillon			5 <sup>ème</sup> échantillon			Diesel
	1 <sup>er</sup> pvt	2 <sup>ème</sup> pvt	3 <sup>ème</sup> pvt	1 <sup>er</sup> pvt	2 <sup>ème</sup> pvt	3 <sup>ème</sup> pvt	1 <sup>er</sup> pvt	2 <sup>ème</sup> pvt	3 <sup>ème</sup> pvt	1 <sup>er</sup> pvt	2 <sup>ème</sup> pvt	3 <sup>ème</sup> pvt	1 <sup>er</sup> pvt	2 <sup>ème</sup> pvt	3 <sup>ème</sup> pvt	
Naphtalène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acénaphthylène	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Acénaphthène	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fluorène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phénanthrène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anthracène	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Fluoranthène	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Pyrène	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Benzo(a) Anthracène	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Chrysène	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Benzo(b) Fluoranthène	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Benzo(k) Fluoranthène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo(a)pyrène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dibenzo (a, h) Anthracène	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Indéno(c, d) Pyrène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Benzo(g,h,i) Pérylène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

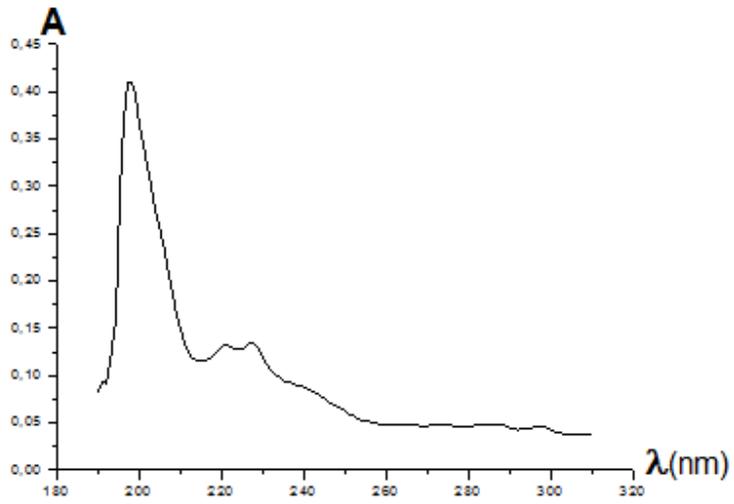
Tableau 8 :La détection des HAP dans pour chaque échantillon.

- ❖ Dans le tableau suivant on va regrouper les spectres résultant par la HPLC.

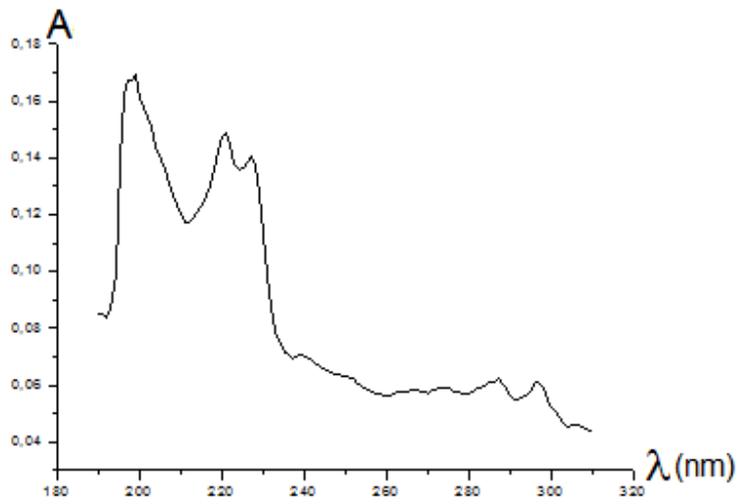
Tableau 9: courbes obtenus par le détecteur UV.

courbes  
d'étalonnage

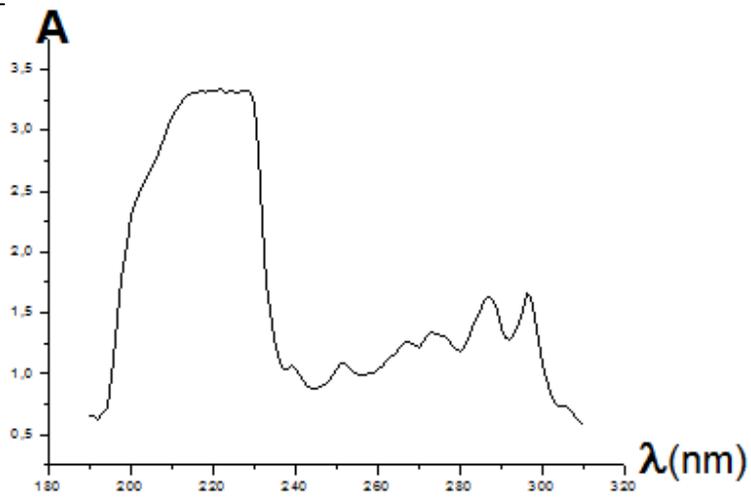
0,025



0,05

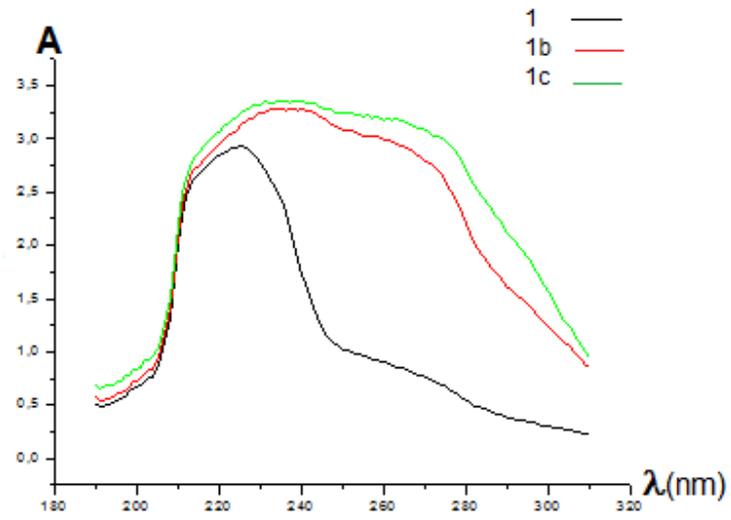


2,5

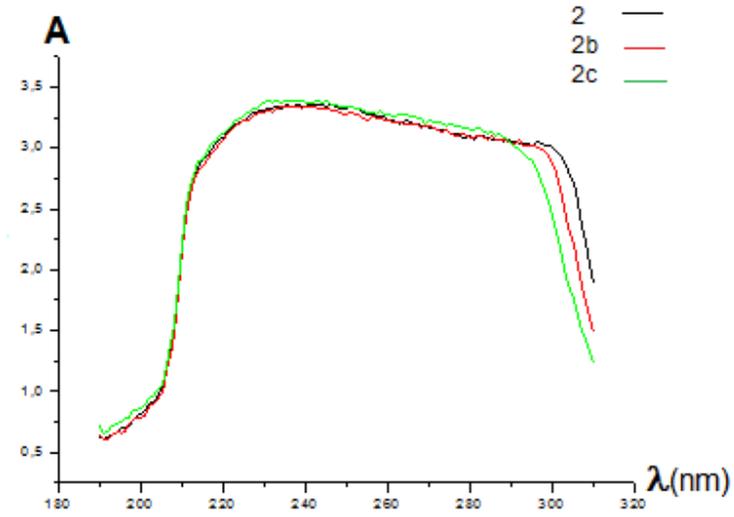


Courbes  
obtenus par le  
détecteur UV

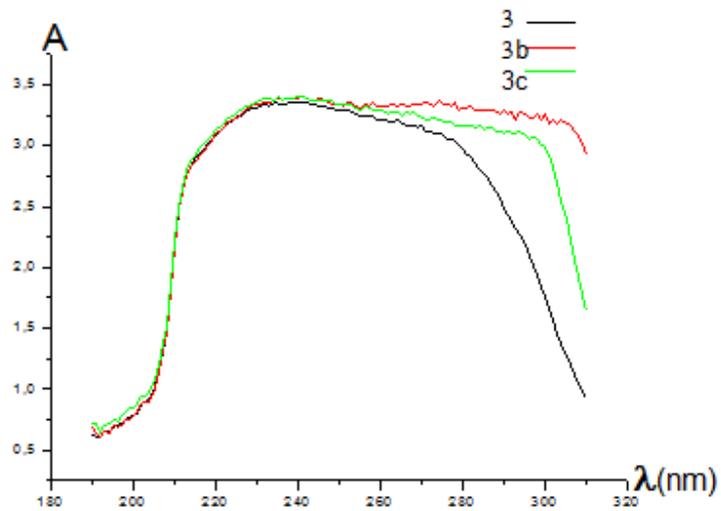
Echantillon 1



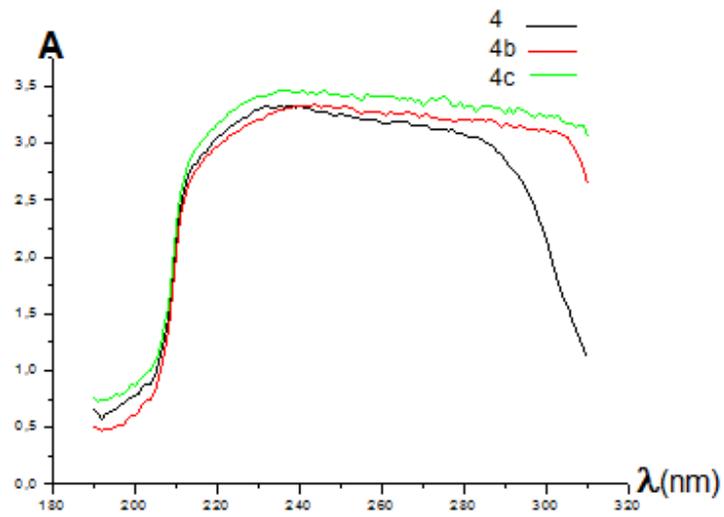
Echantillon 2



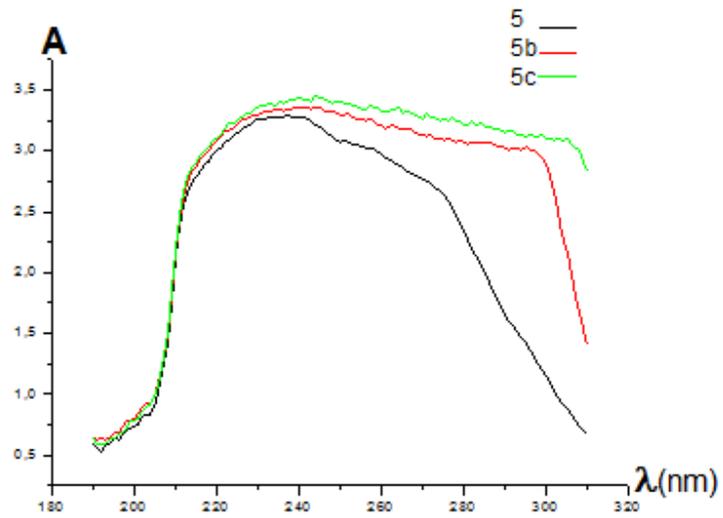
Echantillon 3



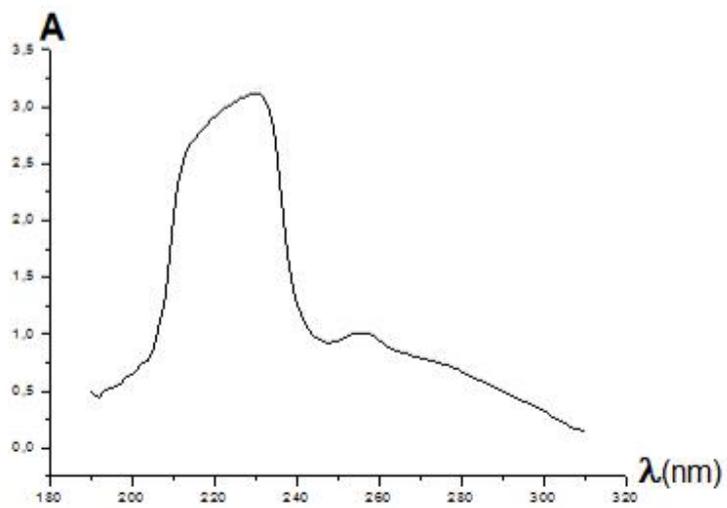
Echantillon 4



Echantillon 5



Diesel



### 3-1-b Résultats de HPLC :

\* Courbes d'étalonnage :

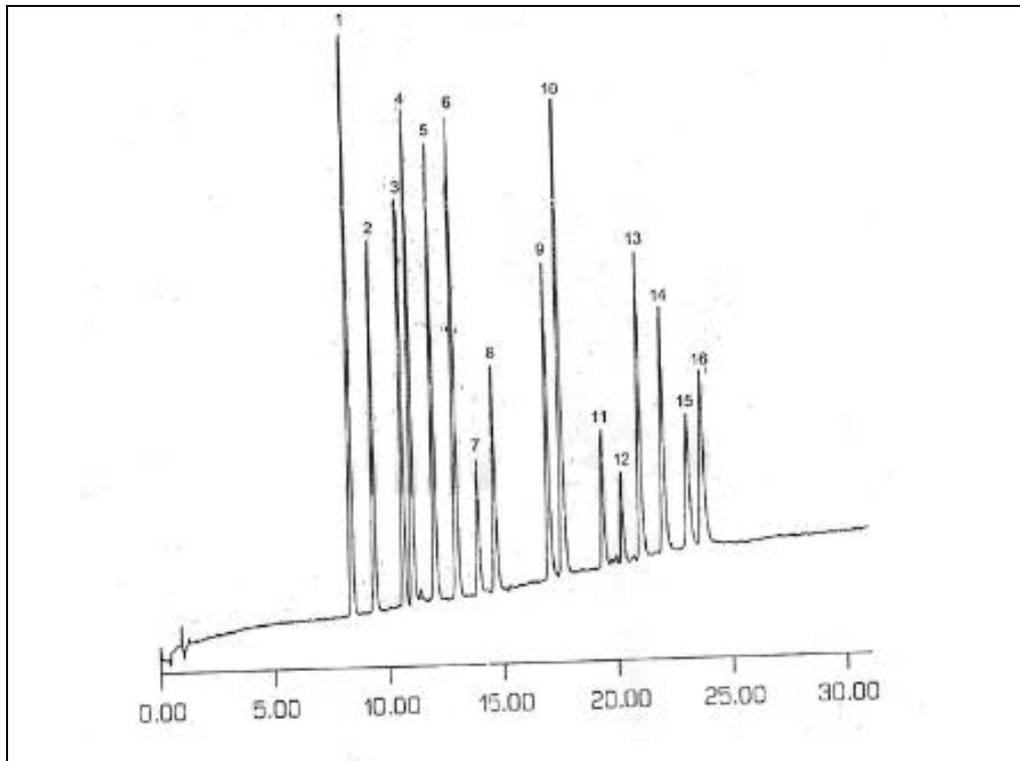


Figure 7 : le chromatogramme d'étalonnage de la solution commerciale.

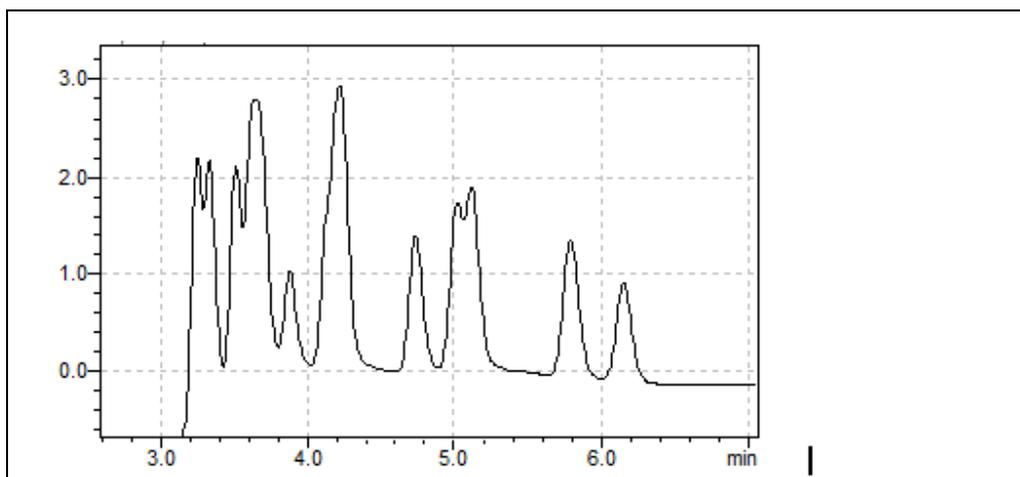


Figure 8 : le chromatogramme d'étalonnage obtenu par notre appareil HPLC.

\* Les chromatogrammes des échantillons analysés :

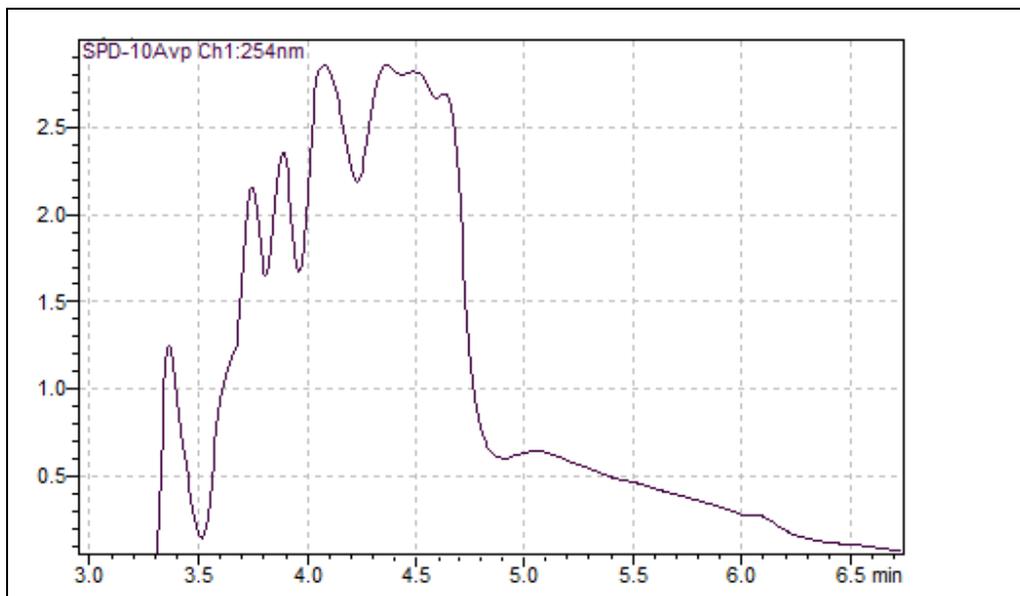


Figure 9 : le chromatogramme de 3<sup>ème</sup> échantillon 1<sup>er</sup> prélèvement.

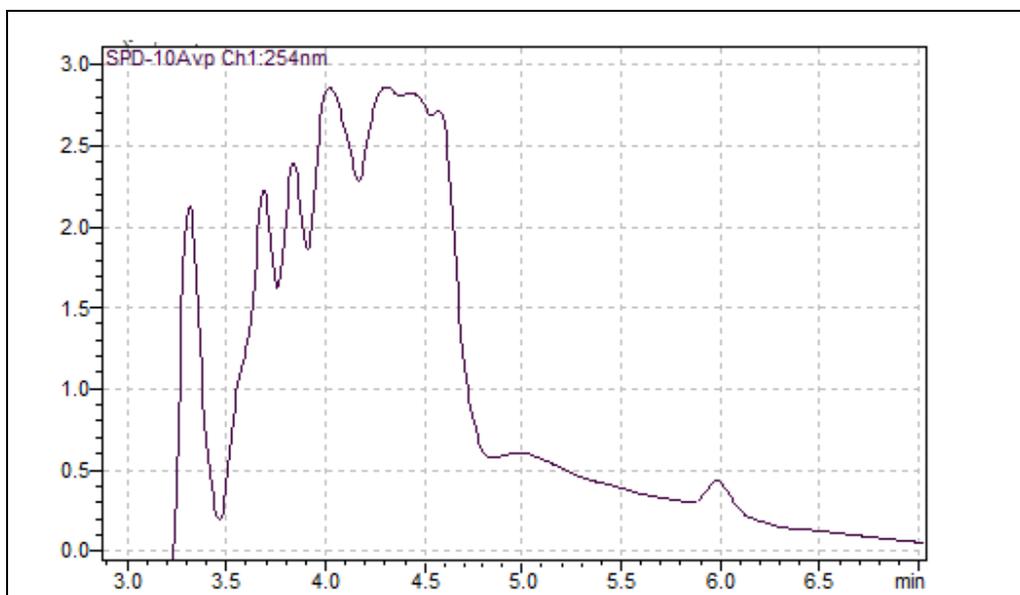


Figure 10 : le chromatogramme de 3<sup>ème</sup> échantillon 2<sup>ème</sup> prélèvement.

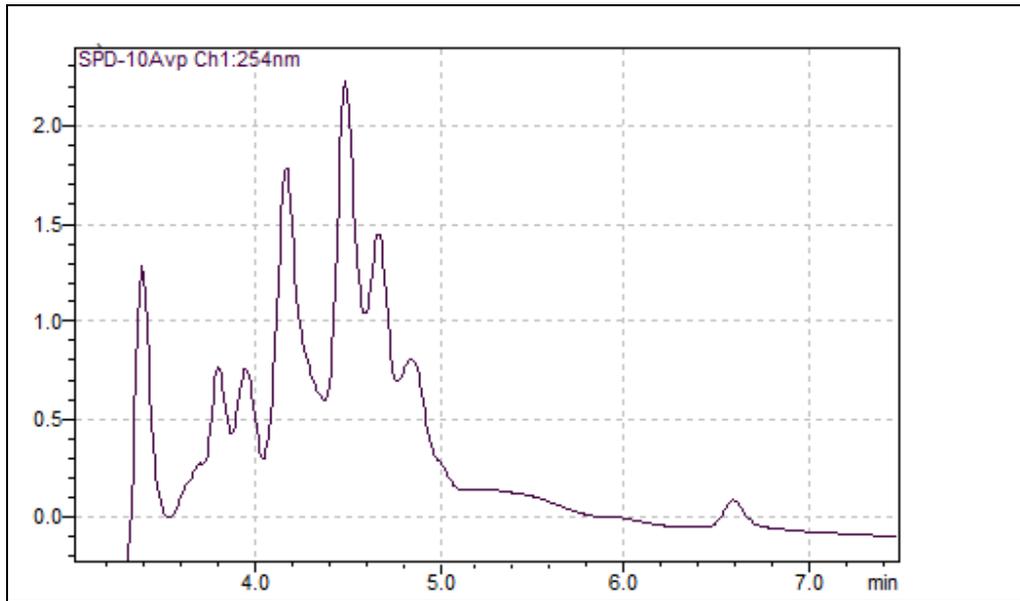


Figure 11 : le chromatogramme de 3<sup>ème</sup> échantillon 3<sup>ème</sup> prélèvement.

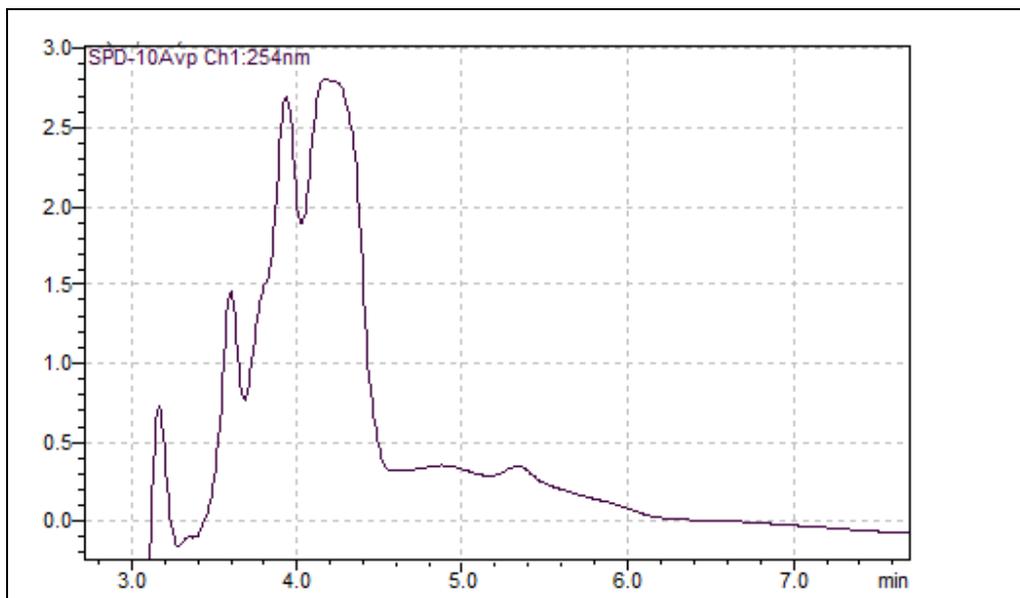


Figure 12 : le chromatogramme de 5<sup>ème</sup> échantillon 2<sup>ème</sup> prélèvement.

### 3-2 Discussions :

#### 3-2-a Discussions des résultats de l'UV :

- Pour les spectres d'étalonnage on a obtenu des spectres différents pour chaque concentration avec la détection des 16 HAP.

- 1<sup>er</sup> échantillon :

- le 1<sup>er</sup> prélèvement on a la détection d'Acénaphthylène et Acénaphthène.

-le 2<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection de Fluoranthène.

-Le 3<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection d'Acénaphthylène, Acénaphthène et Fluoranthène.

Pour cet échantillon on n'a aucune dégradation des HAP.

- 2<sup>ème</sup> échantillon :

-Le 1<sup>er</sup> prélèvement on a la détection de Pyrène et Benzo(a)Anthracène.

-Le 2<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection de Pyrène, Benzo(a)Anthracène et Anthracène.

-Le 3<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection de Pyrène et Chrysène.

Pour cet échantillon, dans le 2<sup>ème</sup> prélèvement on a une apparition d'Anthracène qui est un HAP léger que le Pyrène et Benzo(a)Anthracène, donc on peut dire on a une dégradation avec l'apparition d'un HAP plus lourd qui est le Chrysène dans le 3<sup>ème</sup> prélèvement, ce qui veut dire qu'il faut plus de temps pour que la bactérie naturelle puisse dégrader les HAP.

- 3<sup>ème</sup> échantillon :

-Le 1<sup>er</sup> prélèvement on a la détection de Pyrène.

-Le 2<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection de Pyrène, Benzo(b)Fluoranthène , Dibenzo (a, h)Anthracène et Anthracène.

-Le 3<sup>ème</sup> prélèvement on la détection de Pyrène et Benzo(a)Anthracène.

Pour cet échantillon, dans le 2<sup>ème</sup> prélèvement on a une apparition de Benzo(b) Fluoranthène et de Dibenzo (a, h) Anthracène qui sont lourds que le Pyrène et l' Anthracène qui est léger que le Pyrène et dans le 3<sup>ème</sup> prélèvement on a l'apparition de Benzo(a)Anthracène qui est plus léger que Benzo(b)Fluoranthène , Dibenzo (a, h)Anthracène, donc on a une dégradation.

- 4<sup>ème</sup> échantillon :

-Le 1<sup>er</sup> prélèvement on a la détection de Fluoranthène et Chrysène.

-Le 2<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection de Benzo(a)Anthracène, Indéno(c, d) Pyrène et Chrysène.

-Le 3<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection d'Anthracène, Fluoranthène et Benzo (a) Anthracène.

Pour cet échantillon, dans le 2<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection de Benzo(a)Anthracène qui est léger que le Chrysène avec une détection d'un HAP plus lourd qui est l'Indéno(c, d) Pyrène et dans le 3<sup>ème</sup> prélèvement,

on a la détection d'Anthracène qui le plus léger ce qui veut dire qu'il existe une dégradation.

- 5<sup>ème</sup> échantillon :

- Le 1<sup>er</sup> prélèvement on a la détection de Fluoranthène.

- Le 2<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection de Benzo(a)Anthracène, Chrysène, Indéno(c, d) Pyrène et Dibenzo (a, h) Anthracène.

- Le 3<sup>ème</sup> prélèvement on a la détection de Pyrène, Chrysène et Benzo (g,h,i)Pérylène.

Pour cet échantillon on n'a pas une dégradation pour chaque prélèvement on a une augmentation de nombre de cycles et apparition des HAP plus lourds.

Diesel : les HAP détectés sont : Acénaphène, Acénaphylène et Benzo(b) Fluoranthène.

- \* A partir de ce qu'on a obtenu la dégradation est faible dans les échantillons 2,3 et 4 et elle est nulle dans les échantillons 1 et 5 malgré la présence des bactéries et de NPK dans ce dernier.

### 3-2-b Discussions des résultats de la HPLC :

Les chromatogrammes de la figure 6 et la figure 7 sont de la même solution mère mais ils sont différents à cause des conditions chromatographiques qui sont différents, on va donner une comparaison dans le tableau suivant :

Conditions chromatographiques	Chromatogramme de figure 6	Chromatogramme de figure 7
Phase mobile	Acétonitrile/eau	Acétonitrile/méthanol
Gradient	Acétonitrile/eau -40/60 pendant 2 minutes. -100/0 pendant 20 minutes. -100/0 pendant 30 minutes. -40/60 pendant 31 minutes.	Acétonitrile/méthanol -40/60 pendant 2 minutes. -100/0 pendant 20 minutes. -100/0 pendant 30 minutes. -40/60 pendant 31 minutes.
Volume injecté	10 µl	20 µl
Débit	1,5 ml/min	1 ml/min

Tableau 10 : comparaison des conditions chromatographiques.

- \* Pour les quatre chromatogrammes restants, si on fait une comparaison avec le chromatogramme de la figure 7, le chromatogramme de 5<sup>ème</sup> échantillon donne un résultat, c'est-à-dire il existe une dégradation de certains HAP. Pour le 3<sup>ème</sup> échantillon les premiers chromatogrammes sont identiques avec une faible résolution des pics, pour le 3<sup>ème</sup> prélèvement on a une bonne résolution des pics mais on n'a pas arrivé à dire qu'il existe une dégradation ou non.

### 3-3 Conclusion :

A partir de ces résultats on a arrivé à conclure que certains HAP sont dégradables pour les échantillons 2,3 et 4 mais pour la dégradation de tout les HAP il faut plus de temps et un bon control des facteurs influençant la dégradation pour arriver à une dégradation totale.les résultats obtenus par l'UV donnent une résolution que ceux obtenus par la HPLC.

## Conclusions Générale :

L'objectif de ce travail est d'étudier qualitativement la dépollution des sols par les HAP par des techniques biologiques ce qui veut dire la bioremédiation, pour cette on a utilisé des bactéries commerciales de type F10.

Dans le premier chapitre on a passé par une étude bibliographique sur les HAP, leur dégradation avec les techniques de cette dernière et les paramètres qui l'influent.

Dans le deuxième chapitre on passe à l'étude expérimentale, où on a pollué le sol par le diesel et partager le sol dans cinq bacs avec l'ajout de bactérie F10 et de NPK et on a suivi la dégradation au cours du temps. On a passé par une extraction, purification et analyse par HPLC détecteur UV.

Dans le dernier chapitre on a donné les résultats obtenus et on a les discuté, on a arrivé à des résultats moyens, pour les échantillons 2,3 et 4 on peut dire qu'on a une dégradation des HAP car il y à une diminution du nombre des cycles, on peut conclure que pour le 2<sup>ème</sup> échantillon la dégradation est effectué par les bactéries naturelles du sol alors c'est une dégradation exogène, pour le 3<sup>ème</sup> échantillon on a ajouté les bactéries F10 donc la dégradation est indigène, mais pour le 4<sup>ème</sup> échantillon on a ajouté le NPK comme nutriment et on a une faible dégradation indigène.

Pour les la HPLC on a pas arrivé à analyser tout les échantillon a cause du facteur temps, on a fait passer quatre échantillons juste pour prendre la main sur cet appareil, on a remarqué une très faible dégradation pour le 5<sup>ème</sup> échantillon ce qui ne pas remarqué dans les résultats obtenus par l'UV, donc on a de même une dégradation indigène pour le 5<sup>ème</sup> échantillon, où il y à les bactéries F10 et le nutriment NPK.

En fin à partir de ce qu'on a obtenu comme résultats, on a conclu qu'il nous faut plus du temps pour cette étude pour avoir des résultats suffisants, mais le plus bon pour nous dans cette petite recherche c'est qu'on a prendre la main pour l'extraction, en utilisant le dispositif soxhlet, pour la purification, en utilisant la colonne d'alumine et de même pour la HPLC et le détecteur UV.

## Bibliographie :

1. Aziz c., Melcer h., bioremediation of soils contaminated with manufactured gas plant
2. Blasig, R., Schunck, W.H., Jockisch, W., Franke, P. and Müller, H.G., 1984. Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Leuderomyces elongisporus*. I. Products of alkane oxidation in whole cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19, 241-246.
3. Boudershem Amel. Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodetection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures, 2011, p12.

4. Brice Temime-Roussel, 2002. Contribution a l'étude de la partition des hapentre les phases gazeuse et particulaire : validation de la technique de prélèvement par tube denuder annulaire, pp 66,67 et 75.
5. Davies, J.S. and Westlake, D.W.S., 1979. Crude oil utilization by fungi. Canadian Journal of Microbiology 25, 146-156.
6. Directeur Général d'AFNOR. Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques sous forme gazeuse et particulaire, le 20 février 2004 pour prendre effet le 20 mars 2004.p20.
7. F. Chaspoul. Mesures et évaluation de la pollution des sols, p 39.
8. Fedorack, P.M., Semple, K.M. and Westlake, D.W.S., 1984. Oil degradation capacities of yeast and fungi isolated from coastal marine environments. Candian Journal of Microbiology 30, 565 571.
9. Meulenber, R., Rijnaarts, H.H.M., Doddema, H.J. and Field, J.A., 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. FEMS Microbiology Letters 152, 45-49.
10. SOLTANI Mohamed, 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone.281p.
11. Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyama, Y.and Tani, Y., 2002. Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum*YK. Enzyme and Microbial Technology 30, 828-831.
12. -Bertrand, J.C. et Mille, G., 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In: Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J. (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), Chapitre 13, pp. 343-385.
13. -Bispo a., Jourdain m.j. et Jauzein m., (1999), toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs), organic geochemistry, 30, 947-952.
14. -Calvet r. adsorption of organic chemicals in soils, environmental perspectives, 1989, vol. 83, pp 145-177.
15. -Cerniglia ce (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351-368.
16. -Chedly Abdelly. Bioremédiation / phytoremédiation,2006,p 5.
17. -Chiou c. t. Theoretical considerations of the partition of nonionic organic compounds by soil organic. In: reaction and movement of organic chemicals in soils. sawhney, brown eds. brown. Madison (Wisconsin): soil science society of America: American society of agronomy, 1989, pp. 1-30.
18. -Chiou, c.t., Malcolm, r.l., Brinton, t.i., Kile, d.e. water solubilty enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids, *environmental science and technology*, 1986, vol. 24, pp.502-508.

19. -Curtis g.p., Reinhard m., Roberts p.v., sorption of hydrophobic organic compounds by sediments. Amer. chem. soc. symposium series, 1986, vol. 323, pp. 191-216.
20. -Doyle e, Muckian l, hickey am, Clipson n (2008). Microbial pah degradation. *adv. appl. microbiol.* 65: 27-66.
21. -Edwards, d.a.; Luthy, r.g. & Liu, z. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactants solutions. *Environ. sci. technol.* 1991, vol. 25, n°1, pp. 127-133.
22. -Farrel j., Reinhard m. desorption of halogenated organics from model solids, sediments and soils under unsaturated conditions: 2. kinetics. *Environ sci. technol.*, 1994, vol. 28, n°1, pp 63-72.
23. -Frick et al. (2000). Évaluation de la phytorestauration comme technique d'assainissement sur place des sites pollués par le pétrole, présenté à Petroleum Technology Alliance of Canada. Disponible sur un cd-rom distribué par Environnement Canada sous le nom de Phytopet, 2005.
- hydrocarbons from coal tar into water. *Environ. sci. technol.*, 1992, vol. 26, n°11, pp. 2110-2115.
24. -Ineris (2005). "Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques". <http://www.ineris.fr> site consulté le: 31 octobre 2006.
25. -Jouanneau y, Willison jc, rodarie d (1999). Dégradation microbologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Rapport pour l'agence de l'environnement et de la maitrise de l'énergie, ce a grenoble.
26. -Karickhoff, s. n., brown, d. s.; Scott, t.a. sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Water res.*, 1979, vol. 13, pp. 241-248.
27. -Khalil hanna. étude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. 2004, pp73, 91-93.
28. -Klug, M.J. and Markovetz, A.J., 1971. Utilization of aliphatic hydrocarbons by Microorganisms. *Advances in Microbiology Physiology* 5, 1-43.
- 29.-Landry, B.et Mercier M.(1983). Notions de géologie, Modulo Éditeur, Outremont,1983, pp.362- 367).
30. -Laurence BOURCEREAU. Accumulation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans les sédiments de la rivière Doubs, pp 11-12.
31. -Lee, l.s.; rao, p.s.c. & okuda, i. equilibrium partitioning of polycyclic aromatic.
32. -Mackay d., and shiu w.y. aqueous solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons *j. chem. eng. data*, 1977, vol. 22, n°4, pp. 399-402.
33. -Mahjoub b., comportement dans le sol de polluants aromatiques issus du goudron de houille.
34. -Mccray, j.e. and dugan, p.j. nonideal equilibrium dissolution of trichloroethene from a decane-based napl mixture: experimental and modeling investigation, *water resources research*, 2002, vol.38, n°7, pp.22-29.

35. -McCray, j.e., bai, g., brusseau, m.l, miller, r. biosurfactant-enhanced solubilization of naphthalene mixtures, *J. Contam. Hydrol.*, 2001, vol. 48, n°1, pp.45-68.
36. -Miller M.N. and al. (2004). Effects of nutrients, amendments and temperature on the biodegradation of pentachlorophenol contaminated soil, *Water, Air, and Soil Pollution* #151, p. 87-101.
37. -Neely w.b., branson d.r., blau g.e. partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environ. sci. technol.* 1974, vol. 8, pp.1113-1115.
38. -R.Jeannot, B.Lemière, S.Chiron et F.Augustin, D.Darmendrail. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués, 2000, pp 44-57.
39. -R.Jeannot, B.Lemière, S.Chiron et F.Augustin, D.Darmendrail. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués, édition BRGM 298, 2001, p 41.
40. -Renoux a.y., millette d., tyagy d. et samson r., (1999), detoxification of fluorene, phenanthrene, carbazole and p-cresol in columns of aquifer sand as studied by the microtox assay, *Wat. Res.*, 33, (9), 2045-2052.
41. -Sophie GABET. Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique, 2004, p 33.
42. -Stegmann r. brunner g. calmano w. matz g. (eds.). *Treatment of Contaminated Soil, Fundamentals Analysis Applications*. Berlin : Springer-Verlag, 2001, 658 p.
43. -Verschueren, k., *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*, 3<sup>ème</sup> édition. Van Nostrand Reinhold, New York: International Thomson Pub. Co., 1996, 2064 p.
44. -Whitehouse b.g. the effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chem.* 1984, vol. 14, pp. 319-332.

## Annexe :

Fiche MSDS :

produits	Acétone	Acétonitrile	Hexane	cyclohexane	dichlorométhane
Formule brute	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Masse molaire	58,079 g/mol	41,0519 g/mol	86,1754 g/mol	84,1595 g/mol	84,933 g/mol
T de fusion(°C)	-94,6	-46	-95,3	6,47	-95,1
Td'ébullition (°C)	56,05	82; 81,6	68,73	80,75	40
Masse volumique(g.cm <sup>-3</sup> )	0,783	0,8	0,6594	0,7786	1,33
T d'auto-inflammation(C°)	465 ou 538	524	225	260	556
Pression de vapeur à 20°C	228 mbar	9,7 kPa	151mmHg (25 °C)	12,7 kPa	47,4 kPa à 20 °C
Précautions	Inhalation: irritation bronchique, troubles respiratoires, ébriété, obnubilation. Yeux : rougeurs, douleur Ingestion : ébriété, obnubilation.	Il est nocif et inflammable. Il peut pénétrer par voie orale, cutanée ou par inhalation.	Produit chimique nocif, facilement inflammable et dangereux pour l'environnement	Produit chimique nocif, facilement inflammable et dangereux pour l'environnement	Produit chimique nocif et cancérigène