

# Bioremédiation des Boues ex-Réservoirs des Raffineries de Pétrole.

NYOLO LONEMA Jean-Marie<sup>1</sup>, KOY KASONGO Ruben <sup>2\*</sup>, MAWA TUZINGILA Romulus<sup>3</sup>, BIEY MAKALY Emmanuel<sup>1</sup>

## Paper History

Received : September 23, 2020

Revised : January 21, 2021

Accepted : February 14, 2021

Published : March 27, 2021

## Keywords

Exploitation, charcoa, Kinsaku Muanda, Kongo central.

## ABSTRACT

### Bioremediation of Tank Bottom Sludge from Petroleum Refinery.

Arenosols cover extensive areas of oil exploitation in the coastal basin of the Democratic Republic of Congo (DRC). These soils are thus subject to continuous pollution by oil waste products. An experiment in station and *in vitro* was carried out to study the possibility of depollution of polluted sites in the Moanda region (PERENCO-SOCIR) by bio-and phytoremediation. Hence, a combination of micro-organisms from polluted sites was used to degrade *ex-situ*, the ex-reservoir sludges taking into account the optimal conditions of their life in the soil which serves as diluent. The first order kinetic constant was calculated and an interesting value of 0.034/day for a substrate/microorganism ratio of 5.0 in bioreactors was found. Bacteria *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* as well as fungi *Trichophyton sp.* and *Fusarium solani* were effective in large concentrations of hydrocarbons in the soil. Leguminous plants (*Acacia auriculiformis*) have been shown to be of confirmed interest in both bioaugmentation and phytodegradation of pollutants.

<sup>1</sup>Département des Sciences de l'Environnement, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa B.P. 190, Kinshasa XI ;

<sup>2</sup>Département des Géosciences, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, B.P. 190 Kinshasa XI ;

<sup>3</sup>Département d'exploration et production pétrolière, Faculté de Pétrole, Gaz et Energies Nouvelles, Université de Kinshasa,

\*Corresponding author, e-mail: kasongo125@yahoo.fr

## INTRODUCTION

L'exploitation des gisements de pétrole n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier. Cependant, l'extraction, le transport et l'utilisation de cette source d'énergie entraînent des risques de pollution de l'environnement pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois provoquer la destruction des écosystèmes car cette ressource produit d'énormes quantités des déchets. L'élimination des déchets du pétrole de l'environnement nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques [SOLTANI, 2004]. Plusieurs références de la littérature décrivent les plantes comme outil efficient pour la remédiation des métaux toxiques et autres polluants [LEAHY ET COLWELL, 1990 ; NJOKU et al., 2009]. Cependant, la phytoremédiation est une biotechnologie basée sur la symbiose synergique des racines des plantes et des microorganismes du sol pour décomposer, transférer, désactiver

et immobiliser les contaminants de l'environnement [CHAINEAU et al., 1996 ; AZADEH et al., 2013]. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contenus dans les produits pétroliers sont l'un des polluants organiques persistants (POP) les plus retrouvés dans l'environnement.

Parmi les différentes techniques de bioremédiation, la biodégradation par les microorganismes, et en particulier les bactéries, est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin et terrestre. En conséquence, les mécanismes de dégradation des hydrocarbures pétroliers (alcane linéaires, phénylalcane, cycloalcanes, hydrocarbures polycycliques et polyaromatiques) par les bactéries naturelles ainsi que les paramètres pouvant influencer la biodégradation ont été largement étudiés. Cependant, il apparaît que très peu d'études ont été entreprises sur la cinétique de dégradation par ces mêmes bactéries [REMON, 2006 ; ABASSI ET WALID, 2007].

Parmi les effets néfastes induits par la présence d'hydrocarbures dans les sols, on peut citer (i) la diminution de la fertilité chimique, de l'aération et de la perméabilité du sol et (ii) l'augmentation des substances toxiques. Cependant, l'effet toxique majeur induit par les déchets des hydrocarbures chez l'homme est attribué à la présence des hydrocarbures polycycliques aromatiques qui sont cancérigènes [CHAINEAU *et al.*, 1996]. A cet effet, les techniques de bioremédiation et de phytoremédiation sont actuellement utilisées à travers le monde pour la réhabilitation des sites pollués.

Les bactéries et les champignons sont les plus grands responsables de la dégradation des hydrocarbures dans le sol et ce, le plus souvent par la voie aérobie [ATLAS ET CERMIGLIA, 1995 ; ALEXANDER, 1999 ; ANTIZAR-LADISLAO *et al.*, 2005].

ATLAS [1995a] estime qu'environ une centaine de bactéries et fungi sont à mesure de dégrader les hydrocarbures contenus dans le sol en les utilisant comme source de carbone dans leurs métabolismes. Ces organismes sont ubiquistes pour la plupart [ATLAS, 1995a et b ; OLESZCZUK ET BARAN, 2005].

BARATHI ET VASUDEVAN [2001] en ont listé une douzaine de genres, en l'occurrence *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium* et *Proteus*.

LEAHY ET COLWELL [1990] ainsi que FLOODGATE [1995] en ajoutent *Flavobacter*, *Vibrio*, *Achromobacter* et *Acinetobacter*. Tandis qu'ABASSI ET SHQUIRAT [2007] en décrivent le genre *Stenotrophomonas*.

La cinétique de premier ordre est souvent utilisée pour décrire la biodégradation dans les processus d'épuration car son expression mathématique peut facilement être modélisée [BONAVENTURE ET JOHNSON, 1996].

D'autres auteurs [HWANG *et al.*, 2001] ont étudié la bioremédiation des sols contaminés par le gasoil en utilisant la technique de compostage sur un modèle de la cinétique de premier ordre. Leurs résultats : constantes cinétiques de premier ordre d'environ 0,099/jour concordent avec la plupart de résultats expérimentaux des études antérieures en la matière.

ANTIZAR-LADISLAO *et al.* [2005] ont étudié la biodégradation de 16 HAP à différentes températures à l'échelle de laboratoire. La dégradation était effective avec la combinaison de certaines bactéries et champignons, voire même actinomycètes. Leur étude révèle que les cinétiques de premier ordre peuvent de manière satisfaisante, décrire le processus de bioremédiation. Partant, les constantes cinétiques de premier ordre qu'ils trouvèrent se situent entre 0,009 par jour à 70 °C et 0,013 par jour à 38 °C.

L'objectif général poursuivi par cette étude était de contribuer à la réduction des risques écotoxicologiques sur les communautés vivantes exposées aux déchets pétroliers. Il s'agit plus spécifiquement de (d') :

1. isoler les bactéries indigènes capables de biodégrader les hydrocarbures à des concentrations élevées dans le sol;
2. étudier la vitesse spécifique de dégradation en déduisant la constante cinétique de premier ordre du processus de bioremédiation;
3. décrire le comportement des plantes utilisées dans l'essai de phytoremédiation des hydrocarbures.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel

Plusieurs types de matériel ont fait l'objet de cette étude. Il s'agit notamment de la boue, des sols de différentes textures, des plantes de *Pennisetum purpureum* et d'*Acacia auriculiformis* hybride d'*acacia mangium* et des tartres. Ces matériels ont été récoltés à Kinshasa et à Moanda (Kongo central). La ville de Moanda est située au sud-ouest de Kinshasa, le long du littoral atlantique (Figure 1).

#### Boue

La boue a été récoltée dans l'Api-séparateur de la SOCIR à Moanda. Cet Api-séparateur ou décanteur Api est un réservoir utilisé dans la raffinerie pour séparer les huiles de l'eau par le principe gravimétrique. Un échantillon de 20 kg de boue du type mayonnaise y a été prélevé à cet effet.

#### Les sols

Les sols utilisés dans cette étude provenaient de Moanda et de Kinshasa. Conformément aux recommandations mentionnées à l'introduction concernant la texture du sol à utiliser pour un traitement efficace d'une boue, les sols à texture argileuse, limoneuse et sableuse ont été choisis. A Moanda, l'échantillonnage a été pratiqué dans les sols jaunes (argileux) et noirs (limoneux) dans la concession de la SOCIR située dans la localité de NSIAMFUMU à 10 km au Nord de la cité de Moanda. A Kinshasa, les sols limoneux, argileux et sableux ont été prélevés sur le site de l'Université de Kinshasa, notamment dans le terrain de l'ERAIFT (Ecole Régionale pour l'Aménagement Intégré des Forêts Tropicales) pour la terre jaune, au village Kinduku pour la terre noire et au JEEP pour le sable. Le sol sableux utilisé est un sable blanc utilisé comme matériau de construction dans la fabrication des briques. Dans chaque site, un échantillon composite de 1 kg de sol de surface (profondeur 0-25 cm) a été prélevé. La texture ou composition granulométrique de chaque sol a été déterminée au laboratoire de pédologie (Faculté des Sciences agronomiques, Université de Kinshasa) par la méthode de pipette de Köhn sur la terre fine respective. Les résultats obtenus ont été plotés dans le Triangle Textural de USDA (United

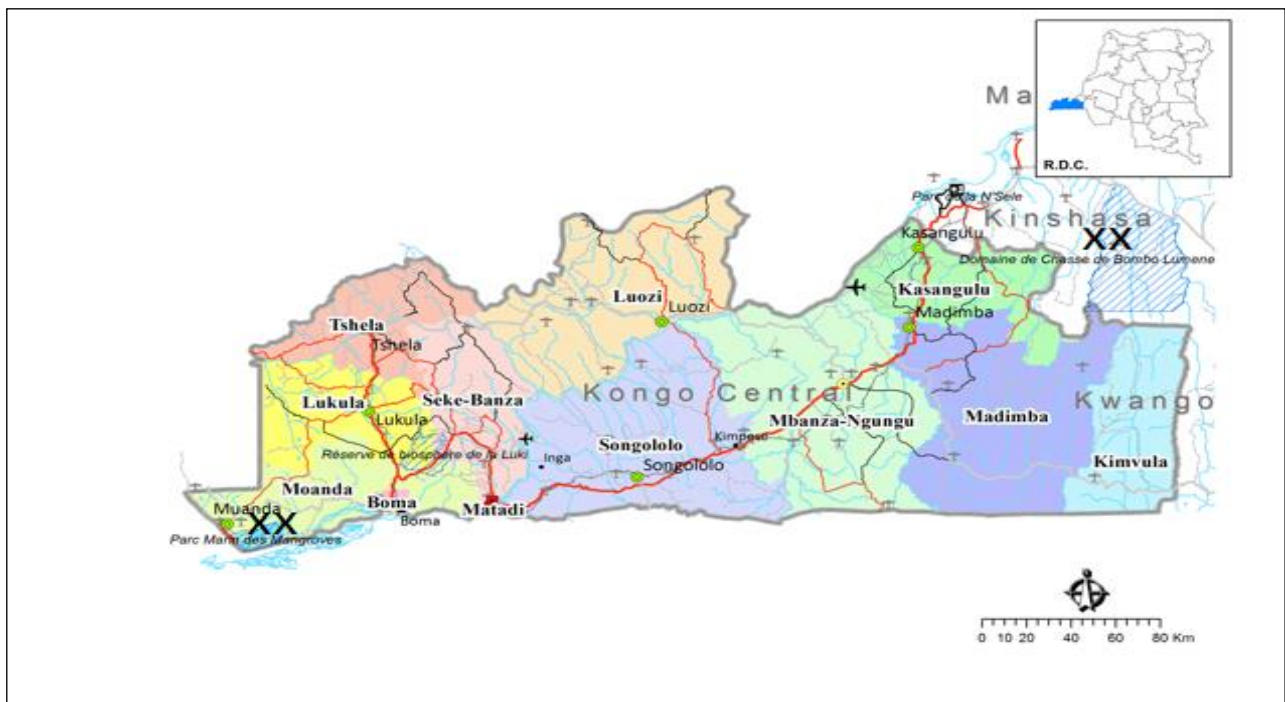


Figure 1. Carte administrative de la province du Kongo central (les sites de prélèvement de différents matériels y sont indiqués par XX) (source : [https://www.caid.cd/graphics/province/12\\_Kongo-Central.png](https://www.caid.cd/graphics/province/12_Kongo-Central.png))

States Department of Agriculture) pour en extraire la classe texturale correspondante : (i) sol sableux (sable 85 % ; limon 12% et argile 3%), (ii) sol limoneux (sable 27% ; limon 53% et argile 20%) et (iii) sol argileux (sable 45% ; limon 4% et argile 51%).

#### Les plantes graminées

Trois espèces de plantes ont été choisies pour l'expérimentation : deux herbacées (*Pennisetum purpureum* et *Sorghum bicolor*) et une plante supérieure- *Acacia auriculiformis* hybride d'*Acacia mangium*. La germination de plantes a été réalisée en pépinière sur le sol limoneux d'abord, puis les plantes obtenues ont été distribuées sur les autres types de sols utilisés. Le sol limoneux offre une large possibilité de rencontre avec les bactéries symbiotiques de toutes sortes (rhizobium). Si le *Pennisetum* est réputé pour son pouvoir d'extraction des métaux lourds, l'utilisation d'*Acacia* par contre, se justifie par sa croissance rapide quelque soit le niveau de fertilité du sol utilisé. Ces deux espèces ont permis d'enrichir le sol en azote (par fixation symbiotique) et d'augmenter l'activité des microorganismes (*Rhizobium*). Quant à *Sorghum bicolor*, son choix se justifie pour la sensibilité de ses racines sur les huiles des hydrocarbures [CHAINEAU et al, 1996].

#### Les tartres des canaux d'évacuation des garages

Les tartres utilisés ont été échantillonnés à Kinshasa dans les garages Lokole (commune de Lemba), de l'Archidiocèse catholique de Kinshasa (commune de Limete) et de l'Intendance de l'UNIKIN (commune de Lemba). Un échantillon de 0,10 kg de tartres a été prélevé dans chaque garage.

## Méthodes

### Analyses physico-chimiques, biochimiques et bactériologiques

La caractérisation physico-chimique de la boue utilisée dans cette étude a été réalisée au laboratoire de chimie de l'Office Congolais de Contrôle (OCC-Kinshasa) par photo-spectrométrie d'absorption atomique (métaux lourds) et par chromatographie en phase gazeuse avec lecture par spectromètre de masse au laboratoire de chimie de la Faculté des Sciences, Université de Kisangani conformément au protocole ISO 18287 [ISO, 2006]. Les analyses microbiologiques et biochimiques par contre, ont été réalisées à l'Institut National des Recherches Biomédicales de Kinshasa (INRB) où s'est déroulé également l'isolement bactériologique suivant le protocole biochimique d'Api 20E BIOMERIEUX [2001]. Pour modéliser la pollution du sol contaminé par les hydrocarbures, le carbone organique total (COT) dans le sol a été dosé au laboratoire de l'OCC-Kinshasa.

### Dilution de la boue

La dilution de la boue par les sols limoneux (S1), argileux (S2) et sableux (S3) a été réalisée en mélangeant soigneusement une quantité volumique de  $10^{-3}$  m<sup>3</sup> de boue avec  $5 \cdot 10^{-3}$  m<sup>3</sup> de sol de chaque type textural jusqu'à l'homogénéisation complète.

### Dispositif expérimental

a) L'expérimentation a été réalisée au Jardin Expérimental et Elevage des Parcelles (Faculté des Sciences, université de Kinshasa). L'objectif était de tester le comportement des plantes sur les polluants et la bio-augmentation de leurs rhizobiums dans la dégradation des polluants du sol issus des hydrocarbures ;

b) Les digesteurs : sols de dilution des polluants contenant des cultures des graminées dans les conditions naturelles.

Objectif : tester la compétence des microorganismes à digérer les polluants sous différentes conditions naturelles.

c) Les Sacs de cultures : sols de dilution des polluants contenant des cultures des légumineuses et/ou graminées dans les conditions naturelles du jardin.

Objectif : tester la compétence des microorganismes à digérer les polluants sous différentes conditions naturelles.

d) les Réacteurs : Tubes à essais contenant des microorganismes sélectionnés pour être testés sur un sol aéré et enrichi au NPK dans les conditions du laboratoire.

Objectif : Etudier la cinétique de dépollution du sol par les bactéries reconnues compétentes.

## Procédures

L'essai de culture était réalisé en station au jardin expérimental de la Faculté des Sciences, Université de Kinshasa suivant un dispositif complètement randomisé. Huit sacs de culture et cinq digesteurs ont été montés grâce à la dilution obtenue par le rapport (5 :1).1 :4 signifiant 1 volume de boue mélangé avec 5 volumes équivalents de terre, le tout formant une unité (1) à superposer sur 4 unités équivalentes de sol non pollué de même texture. Les digesteurs étaient faits de pots en PVC de  $3.10^{-3} m^3$  chacun et les sacs de cultures étaient des plastiques de  $10^{-2} m^3$  chacun.

Leurs constitutions et leurs caractéristiques sont présentées dans le [Tableau 1](#) suivant :

*Tableau 1. Caractéristiques du dispositif expérimental réalisé au jardin (essais en station)*

Sol limoneux		Sol argileux		Sol sableux	
Nom du dispositif	Caractéristique	Nom du dispositif	Caractéristique	Nom du dispositif	Caractéristique
Sac 1	Culture de Pennisetum, Sorghum et Acacia avec boue. S1Kin*	Sac 5	Culture de Pennisetum et Acacia avec boue. S2Kin**	Sac 7	Culture de Pennisetum et Acacia avec boue. S3Kin***
Sac 2	Culture de Pennisetum, Sorghum et Acacia sans boue. S1Kin*	Sac 6 (témoin)	Culture de Pennisetum et Acacia sans boue. S2Kin**	Sac 8 (témoin)	Culture de Pennisetum et Acacia sans boue. S3Kin***
Sac 3	Culture de 3 pieds de sorghum bicolor avec boue. S1Kin*	Digesteur 4	Transparent, ventilé, ensoleillé. S2Mda****	Digesteur 5	Transparent, ventilé, ensoleillé. S3Kin***
Sac 4	Culture de 3 pieds de Sorghum bicolor sans boue. S1Kin*				
Digesteur 1	Transparent, ensoleillé et ventilé. S1Mda****				
Digesteur 2	Transparent, ensoleillé et non ventilé. S1Mda****				
Digesteur 3	Non transparent, non ensoleillé (mais éclairé) et ventilé. Bioaugmentation utilisant la culture de Sorghum bicolor. S1Mda****				

\*Sol issu de la litière sous un peuplement d'arbres de *Milletia laurentii* contaminés de champignons microscopiques sur le site de l'Université de Kinshasa.

\*\*sol issu du Mont Amba à Kinshasa (site dit « terre jaune »)

\*\*\*sol issu de la carrière de sable du triangle de CNPP (Centre Neuro-Psycho-Pathologique de Kinshasa) à Kinshasa

\*\*\*\*sol issu des sites pollués par les hydrocarbures à Moanda dans la province du Congo Central.

Toutes les unités expérimentales ont été arrosées par 0,5 litre d'eau par jour.

Nonante jours après, les échantillons de  $10^{-3}$  kg de sols contaminés issus des digesteurs et sacs de cultures (prélevés à 0,07 m de profondeur) ont été portés dans les bouillons au thioglycolate et dans les bouillons à l'eau peptonnée pour enrichissement pendant 4h d'incubation à 37 °C. Puis, 3 oses issues des bouillons inséminés ont été cultivées dans différents

milieux d'isolement contenus dans des boîtes de Pétri et des tubes à essai.

Les sols contaminés de Moanda et les tartres des canaux d'effluents des garages de Kinshasa ont subi la même opération de culture.

Les cultures ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures sur gélose au sang et sur le milieu Mc Conkey ainsi que sur le Sabouraud. Après cette incubation, une lecture macroscopique a

permis d'isoler les colonies d'après leurs caractéristiques de taille, de couleur et d'épaisseur. Ainsi, les colonies ont été à nouveau portées singulièrement aux nouvelles cultures pendant 24 heures.

Les bactéries isolées ont été enfin cultivées dans des solutions d'eau physiologique BSM (basal mineral salt medium) de composition (décrite par l'INRB comme suit : 0.64g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0.31g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0.5g NH<sub>4</sub>Cl ; 0.2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ; 0.005g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O par litre d'eau distillée ; pH 7) à 37 °C pendant toute la période d'expérimentation et y constituent ainsi le stock bactérien pour servir d'inoculum dans les dispositifs mesurés pour la bioremédiation (bioréacteurs).

A l'aide de 20 tests biochimiques Api 20<sup>E</sup> Biomérieux [BIOMERIEUX, 2001], les bactéries ont été identifiées.

Les résultats de ces tests biochimiques sont interprétés en se servant des codes spécifiques [BIOMERIEUX, 2001].

Quant aux champignons, leur identification s'est réalisée par le protocole des cartes d'identification via la microscopie.

Pour établir la cinétique de dégradation, les échantillons de 3.10<sup>-2</sup> kg de sable blanc et très fin dépouillé de toute matière organique ont été recueillis dans 20 boîtes en verre de 0,5 litres et stérilisés dans l'autoclave à 180 °C pendant 6 heures en raison de 3 heures par jour.

Ces boîtes ont servi de bioréacteurs pour expérimentation de la bioremédiation. Un tissu gazeux était placé au fond de chacune d'elles pour faciliter l'aération par un microcompresseur à air.

Dans chaque boîte, un mélange parfait sol-boue a été réalisé avec 0,002941 kg de slop déshydraté par la distillation hétéroazéotropique et 3.10<sup>-2</sup> kg de sol stérile.

Les différentes boîtes ont été inoculées par des bactéries isolées et stockées dans les solutions d'eau physiologique. Des conditions favorables aux bactéries ont été créées dans les boîtes :

- oxygène : aération par microcompresseur sur une Hotte à gaz ;
- NPK : apport de l'azote sous-forme de sels d'ammonium et de phosphate sous-forme d'orthophosphate (10<sup>-3</sup> kg de NPK tous les dix jours) ;
- humidité du sol (25 à 90 %) : assurer par ajout de 0,015 litres d'eau minéralisée stérile contenant les nutriments ci-haut décrits. Le mélange du sol s'est fait naturellement chaque jour à cette occasion.

La concentration des microorganismes à inoculer provenait de la suspension bactérienne. Elle est mesurée par l'analyse gravimétrique de TSS à la température sèche (105 °C) à l'aide de la balance analyseur d'humidité (moisture balance analyzer Scaltec SMO 01).

Des boîtes sans inoculum ont été des témoins. Cette opération s'est déroulée sur le plateau de Hotte à gaz à la température ambiante de l'air conditionné du laboratoire à la température d'environ 24 °C.

Le montage des bioréacteurs a respecté le calibrage décrit dans le [Tableau 2](#) :

*Tableau 2. Caractéristiques des bioréacteurs*

Bioréacteurs	Poids du sol	Volume de slop déshydraté	TSS	FM ratio
REAi	0,0300 kg	0,002941 kg	0,0005 kg	5.0
REAk	0,0300 kg	0,002941 kg	0,0005 kg	5.0
REAt	0,0300 kg	0,002941 kg	0,000 kg	-

- dans 0,002941 kg de slop déshydraté par distillation hétéroazéotropique, 0,0025 kg de carbone soit 85% des huiles ont été obtenues.
- REAi : bioréacteur à bactéries indigènes originaires de Moanda
- REAk : bioréacteur à bactéries kinoises (issues des tartres et des sols prélevés à Kinshasa)
- REAt : bioréacteur témoin non inoculé

Deux échantillons de 0,0005 kg à 10<sup>-3</sup> kg étaient prélevés des bioréacteurs tous les 2 jours pour l'évaluation de la vitesse de dégradation. Le dosage de leur teneur en carbone organique total (COT) a été réalisé par titrage conformément au protocole du Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec [CEAEQ, 2011].

L'essentiel de ce protocole utilisé au laboratoire de chimie de l'OCC-Kinshasa se résume en deux étapes, (i) oxydation par voie humide, réalisée par le K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> en présence de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, puis (ii) titrage de bichromate de potassium en excès par le sulfate ferreux en présence de diphenylamine comme indicateur d'oxydoréduction.

### Calcul et expression des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en % C. En considérant les concentrations de sulfate ferreux et du bichromate de potassium, chaque millilitre de bichromate de potassium qui réagit correspond à 4 milligramme de C.

Le pourcentage de carbone dans l'échantillon exprimé en % C est déterminé comme suit :

$$C = \frac{(A-B) \times 10 \times 0,004 \times 100}{P \times XA}$$

où

C : concentration de carbone organique (% C);

A : volume de sulfate ferreux utilisé pour le témoin (ml);

B : volume de sulfate ferreux utilisé pour l'échantillon (ml);

10 : volume de bichromate ajouté initialement;

0,004 : nombre de gramme de Carbone par millilitre de bichromate;

P : poids de l'échantillon titré exprimé sur base sèche (en gramme);

100 : facteur pour obtenir un pourcentage.

### Critères d'acceptabilité

Les critères d'acceptabilité sont définis dans le document DR-12-SCA-01 et sont appliqués comme suit :

- Aucun critère n'existe pour le blanc puisqu'il est utilisé comme témoin.
- Les résultats obtenus pour l'analyse de duplicatas ou de réplicats ne doivent pas différer de plus de 20 % entre eux lorsqu'ils sont supérieurs à au moins dix fois la limite de quantification.

### Analyse statistique

La statistique descriptive a été utilisée pour calculer les moyennes et les écart-types de certaines valeurs des teneurs déterminées. Pour déterminer l'impact de la boue sur les sols et l'activité racinaire des cultures réalisées, l'analyse de la variance (ANOVA) avec le test de Fischer a été utilisée.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les propriétés physiques et la composition chimique de la boue ex décanteur Api remédiée dans cette étude sont résumées dans le [Tableau 3](#) :

*Tableau 3. Caractéristiques physiques de la boue ex Décanteur Api*

Type de déchet	Apparence	Huile (%) (hydrocarbure)	Eau (%)	Solides (%)
Boue ex Api-séparateur	Suspension	23 ± 0.5	53 ± 2.1	24 ± 0.6

Ce tableau montre bien que les caractéristiques physiques des boues tirées du décanteur Api de la SOCIR donnent des proportions en eau, huiles et solides similaires à celles décrites par [BIDER ET HUNT \[1982\]](#). En effet, la boue utilisée titre environ 23% d'huiles (hydrocarbures) avec une teneur approximative de 53 % d'eau et se présente effectivement sous forme d'une suspension. Ceci est proche des proportions huiles-eaux décrites dans le rapport de l'Institut Américain du Pétrole (American Petroleum Institute) qui a étudié l'efficacité de séparation de différentes unités de récupération d'huiles [[US EPA, 2010](#)].

En ce qui concerne les teneurs en métaux lourds de la terre sèche contaminée de slop, les résultats obtenus sont présentés dans le [Tableau 4](#). Les valeurs entre parenthèses sont des écart-types des moyennes de 3 répétitions.

*Tableau 4. Teneurs des sols en ETM en mg/kg de terre sèche contaminée de slop*

Elément	Cd	Pb	Hg	Cr	Cu	Ni	Zn
Valeurs obtenues	1,24 (0.01)	84,1 (2.1)	0,58 (0.0)	69,9 (3.0)	90,6 (3.5)	101 (3.5)	180 (5.0)

En comparant les teneurs obtenues à celles des sols normaux, il s'avère que ces teneurs ne représentent pas un danger réel sur les communautés vivantes car elles sont de loin inférieures aux seuils de l'épandage des boues et même à celui requis pour les composts à but agricole, exception faite pour le nickel (Ni) qui est présent en quantité très élevée (101 mg/kg) pouvant conduire à des intoxications surtout chez les animaux vivants, particulièrement chez les populations jeunes [[BAIZE, 2000](#)]. Les normes pour le compost exigent une limite supérieure de 0,7 mg/kg pour le mercure (Hg) ; 120 mg/kg pour le plomb (Pb) et 1 mg/kg pour le Cadmium (Cd) [[BOELEN et al., 1996](#) ; [OLIVERA et al., 1997](#)].

### Toxicité sur les végétaux

L'analyse de la variance (ANOVA) a permis de décider sur l'effet des boues sur les cultures d'*Acacia* et de *Sorghum* au niveau racinaire. Cependant, le degré de liberté étant de 5, la somme des carrés de 56.689, celle des carrés des moyennes de 11.3379 ; le test de Fisher a donné la valeur tabulaire de 9.9991 et celle calculée était de 0.0005876. Le test décele ainsi une différence hautement significative au seuil de 5% (seuil requis pour le terrain) entre les racines évoluant dans le sol pollué et celles qui le sont dans le sol non pollué car la plus petite différence significative est de 5,2 (LSD=5.2).

Ceci confirme l'influence de la boue sur la profondeur des racines. Physiologiquement, certains auteurs [[CHAINEAU et al., 1996](#)] interprètent cela comme un besoin en oxygène qui pousse la plante à chercher plus loin l'air qui se trouve en profondeur sur la partie non imbibée d'huile. Contrairement à [CHAINEAU et al. \[1996\]](#), on peut penser plutôt que cela est probablement dû à la présence massive dans les sols non pollués du champignon *Fusarium solani* qui s'attaque aux racines des plantes parfois jusqu'à détruire ces dernières. Ce champignon provoque un dépérissement racinaire, se traduisant par la formation des chancre mous bruns foncés et noirs sur les tiges, soit au niveau des nœuds soit au niveau des plaies. Ceci n'exclut pas le fait que les racines aient un besoin physiologique en oxygène pour pousser plus loin et trouver une bonne terre comme mentionné par [CHAINEAU et al. \[1996\]](#) et autres. [FATIMA et al. \[2016\]](#) décrivent que les plantes associées à des bactéries endophytes tiennent bien le potentiel d'assainissement de l'environnement pollué. Les modèles de colonisation et activité des endophytes inoculés dans la rhizosphère et l'endosphère de la plante hôte sont parmi les principaux facteurs qui peuvent influencer le processus de phytoremédiation.

Les résultats obtenus révèlent enfin que seules les plantes légumineuses peuvent pousser spontanément dans les sacs de culture contenant les hydrocarbures, car aucune pousse végétale spontanée hormis celles d'*Albizia* n'a été retrouvée sur les sacs des cultures pendant les trois premiers mois d'expérimentation alors que nous étions dans un jardin d'expérimentation plein de végétaux et d'oiseaux.

Au Cameroun, MATSODOUM [2019] a mené une étude, chez les végétaux, qui a révélé que la tolérance aux HAP est plus accrue chez *Eleusine indica* et *Cynodon dactylon* par rapport à *Altermanthera sessilis*. La culture mixte de *E. indica* et *C. dactylon* est très impactée par les HAP. En culture seule, le ralentissement des processus physiologiques de *C. dactylon* dans les sols pollués n'a pas d'impacts majeurs sur ses capacités phytoremédiatrices. Ceci permet donc de recommander *C. dactylon* pour la gestion durable des sols pollués par les hydrocarbures dans le monde entier en général, et au Cameroun en particulier ; pour des pollutions de sols n'excédant pas 33500 ppm Ceci revient à dire que les combinaisons ou pas des cultures ont des résultats variés qui méritent d'être étudiés au cas par cas.

### Isolement et identification des microorganismes

Les microorganismes ayant survécu à des doses élevées de la boue diluée aux sols sont décrits dans le Tableau 5.

Tableau 5. Bactéries et fungi ayant survécu à des doses élevées de boue diluée aux sols

Type de microorganismes	Sol limoneux de dilution (80 %)	Source de C : boue ex Api-séparateur (20%)	Inoculum	
Bactéries	Bacillus cereus	+	+	Limon de Kinshasa et de Moanda
	Enterobacter cloacae	+	+	Limon de Moanda
	E. coli	+	+	Tartres de garage de Kin et sable de Kin
Fungi	Fusarium solani	+	+	Limon de Kinshasa
	Trichophyton sp.	+	+	Limon de Kinshasa
	Lévures opportunistes	+	+	Limon de Kinshasa

Comme décrit précédemment, les tests biochimiques Api 20<sup>E</sup> ont permis d'identifier les microorganismes qui pouvaient encore évoluer à de très fortes concentrations des hydrocarbures dans le sol. A la dilution de 1/100 de la boue dans le sol, presque toute la flore microbienne persiste. Il devient alors quasiment

impossible d'identifier l'espèce ou les espèces les plus compétitives et les plus spécifiques aux polluants en présence.

A la dilution 1/5 de sol limoneux, trois espèces bactériennes seulement et deux espèces de fungi ont été détectées à la concentration de 20 % de boue dans le sol.

On estime que ces espèces sont parmi tant d'autres susceptibles de s'adapter aux nouvelles conditions créées. Ceci grâce à leurs métabolismes qui utilisent les hydrocarbures contenus dans la boue comme source de carbone dans des réactions de biodégradations.

Il s'agit, pour les bactéries, des espèces ci-après :

- *Bacillus cereus* (autochtone de Moanda-long bâtonnet et de Kinshasa) issues des sols limoneux ;
- *Enterobacter cloacae* (autochtone de Moanda) issues des sols limoneux ;
- *Escherichia coli* (autochtone de Kinshasa) issues des tartres des canaux d'évacuation des effluents des garages ainsi que des sols sableux ;

Pour les champignons, on a trouvé, grâce aux procédés d'identification des champignons sur les milieux de culture Sabouraud à base du protocole INRB qui associe le type d'hyphe, la profondeur des colonies et la vitesse de croissance- les espèces *Trichophyton sp.*, *Fusarium solani* et les levures opportunistes.

On peut bien constater qu'il s'agit là des bactéries et des fungi de l'environnement très peu impliqués dans les problèmes de santé publique. Ceci a facilité toute manipulation de leurs germes sans crainte de risques épidémiologiques majeurs.

La bactérie *Bacillus* n'a pas posé des problèmes d'identification. La coloration gram, l'examen des colonies et l'observation au microscope ont suffi pour déterminer son identité. La morphologie du germe correspond à un grand bacille en forme de bâtonnet de 1 µm de large pour 3 à 4 µm de long, sporulé, mobile grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 µm et d'un diamètre moyen de 1,4 µm et de type respiratoire aéro-anaérobie, présentant une positivité à la coloration de Gram, et synthétisant deux types de toxines : une toxine thermostable et une toxine thermolabile.

Quant à *Enterobacter cloacae*, il a fallu exécuter à deux reprises les 20 tests biochimiques du standard BIOMERIEUX. Cette bactérie a obtenu le score **7305573**, ce qui correspond à son code standard Api 20<sup>E</sup> Biomérieux.

L'espèce bactérienne *Bacillus cereus* est hydrophile car elle présente une tension superficielle élevée ( $\gamma_{BV}=76$ ). On peut donc l'utiliser pour le traitement des effluents liquides des sociétés pétrolières. C'est aussi le cas pour l'espèce *E. coli*. L'accroissement de l'interface hydrocarbure-eau permet aussi de diminuer les concentrations des polluants puisque l'oxydation biologique se retrouve ainsi intensifiée et que les

microorganismes présents peuvent utiliser les hydrocarbures comme nutriments [MOCHALOVA et al., 2002]. A ce sujet, MATSODOUM [2019] fait remarquer que seuls les HAP sont susceptibles d'interagir avec l'eau dans l'environnement raison de leurs propriétés physico-chimiques et plus particulièrement leur solubilité plus élevée que les composés aliphatiques et les naphènes qui sont solubles.

Pour être sûr dans l'identification, il était important de savoir qu'il existe une souche génétiquement modifiée de *B. cereus* qu'on appelle *Bacillus thuringiensis* qui est également aérobie facultatif et gram positif. SOLTANI M. [2004] fait remarquer qu'il est génétiquement indistinguable de *B. cereus* excepté en une protéine de l'endospore responsable de la production des inclusions cristallines parasporales qui sont toxiques aux larves des insectes de l'ordre des diptères, coléoptères et lépidoptères. D'où l'intérêt de *B. thuringiensis* comme biopesticide. Le test biologique sur les larves des moustiques permet de distinguer le *B. cereus* (Bc) du *B. thuringiensis* (Bt). Cette dernière est pesticide. Ceci a permis de faire la démarcation entre les deux.

### Influence des propriétés physico-chimiques des sols

En ce qui concerne le dosage de COT dans les digesteurs et sacs prélevés à différents endroits (paroi, centre, fond), l'analyse de la variance (ANOVA) a mis en évidence une différence significative du niveau de traitement selon les textures de sols de dilution : le sol argileux est le meilleur filtre des déchets, le limon en est le pourvoyeur en microorganismes alors que le sol sableux offre la facilitation de l'aération. Pour une bioremédiation efficace, un circuit de traitement associant l'utilisation des sols de différentes textures à différentes strates est à conseiller : l'argile servant au blindage de profondeur pour éviter de contaminer les eaux souterraines, le limon mélangé au sable servant de diluant pour l'épuration de la boue.

### Cinétique de biodégradation par le couplage d'espèces

La croissance microbienne dans les bioréacteurs est un aspect très important dans le traitement des polluants par la bioremédiation. Des graphiques de modélisation mathématique sont produites pour présenter la cinétique de dégradation des polluants et se fondent sur les équations (1), (2) et (3) données ci-dessous.

Deux bioréacteurs à culture mixte d'une part de *Bacillus cereus* et *Enterobacter cloacae* (deux espèces très liées écologiquement), ainsi que celle de *Pseudomonas putida* et *Escherichia coli* de l'autre. CHAINEAU et al. [1995] ont décrit l'aptitude métabolique d'*E. coli* dans la dégradation des hydrocarbures dans le sol. La formule générale de cinétique des réactions des matières peut servir à dégager la cinétique de premier ordre qui décrit la vitesse de réduction du carbone organique total :

$$\frac{dC}{dt} = -kt \quad (1)$$

où t = temps ; C = concentration de COT ( $\text{mgL}^{-1}$ ) ; k = constante cinétique de 1<sup>er</sup> ordre ( $\text{jour}^{-1}$ ).

Dans l'équation (1), il faut que la concentration microbienne reste constante pendant la période d'expérimentation pour s'assurer que l'effet de la concentration microbienne sur la constante cinétique est négligeable [1].

L'intégration de l'équation (1) conduit à la formule connue de la cinétique de 1<sup>er</sup> ordre ci-après :

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

où  $C_0$  = concentration du COT initial ( $\text{mgL}^{-1}$ )

La linéarisation de cette équation en donne une troisième :

$$\ln \frac{C_0}{C} = kt \quad (3)$$

Les résultats des dosages tous les deux jours du COT dans les bioréacteurs se présentent dans les Figures 2 à 4 :

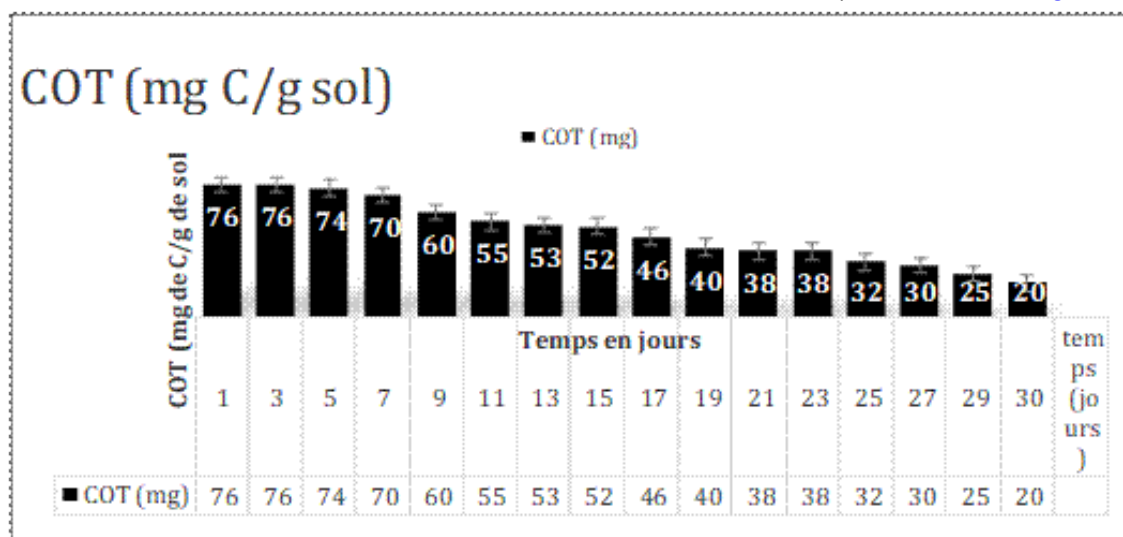


Figure 2. Evolution de COT dans le réacteur indigène (REAi)



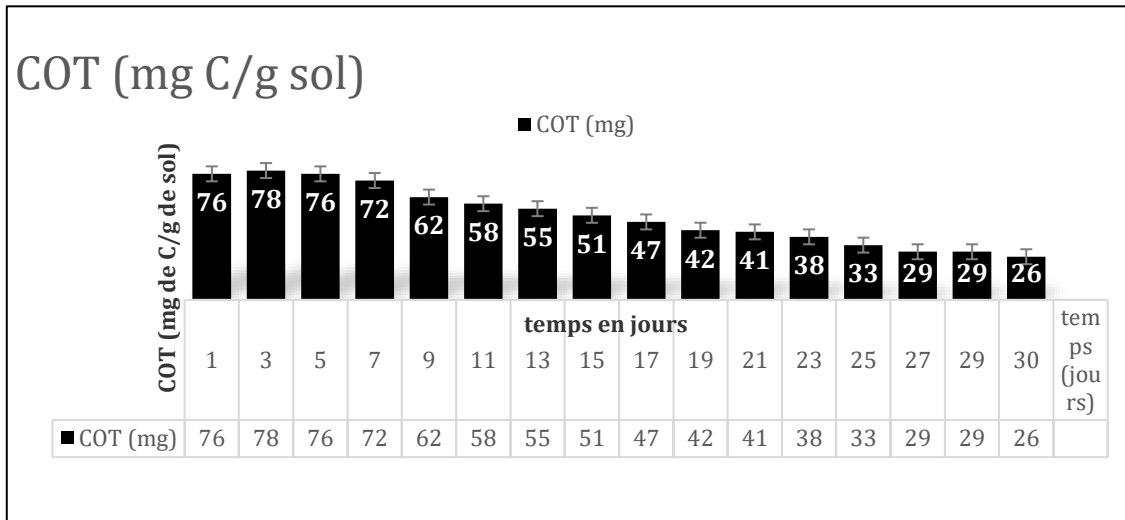


Figure 3. Evolution de COT dans le réacteur aux bactéries originaires de Kinshasa (REAK)

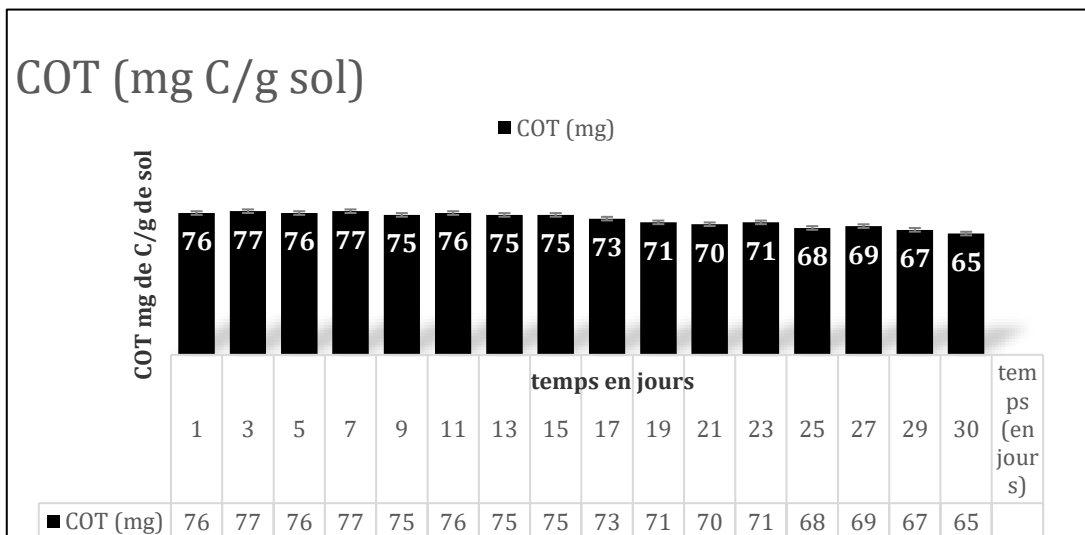


Figure 4. Evolution de COT dans le réacteur témoins (REAt)

La linéarisation des fonctions à base des constantes cinétiques des bioréacteurs est présentée dans les Figures 5 à 8 pour les différents réacteurs utilisés.

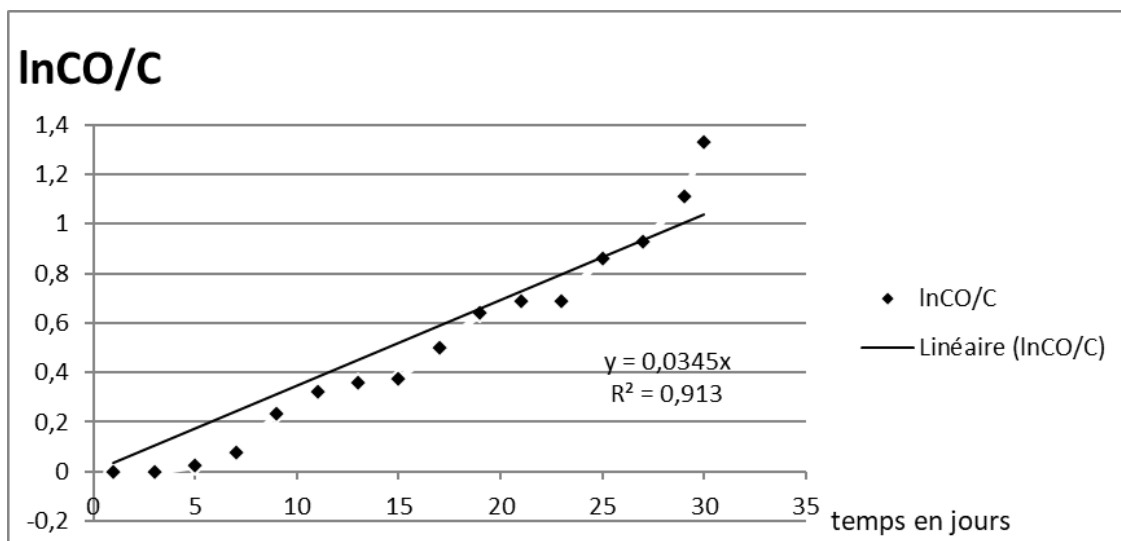


Figure 5. Linéarisation de valeurs progressives de 30 jours : équation de la cinétique du REAt:  $y = 0,0345x$ ,  $r^2 =$ coefficient de corrélation.

Cette Figure montre une forte corrélation positive ( $y = 0,0345x$ ,  $r^2=0,913$ ) et l'efficacité obtenue est meilleure.

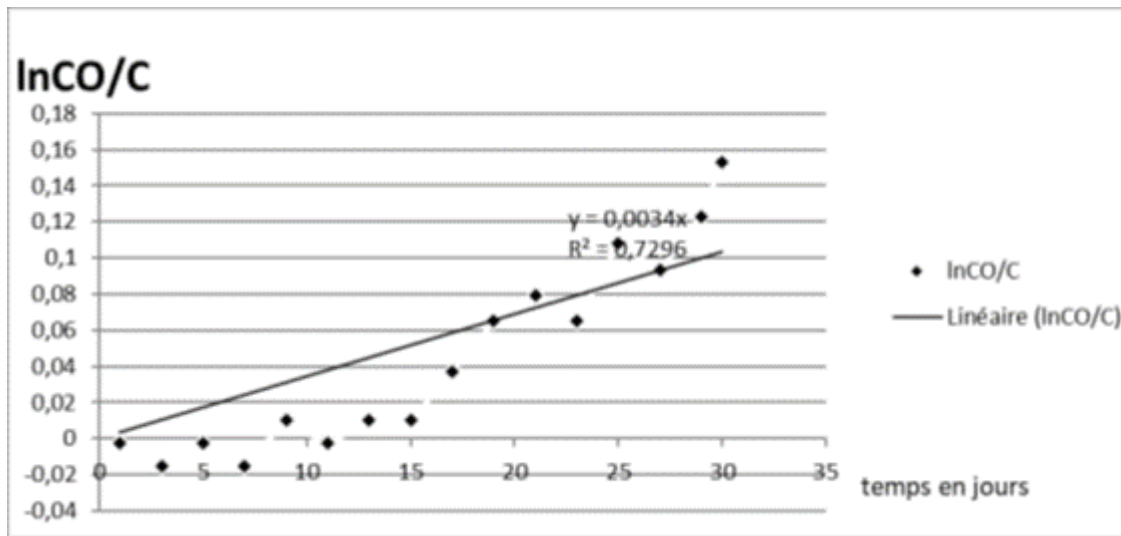


Figure 6. Linéarisation de valeurs progressives de 30 jours : équation de la cinétique du REAk:  $y=0,0315x$ ,  $r^2$ =coefficient de corrélation.

La Figure 6 présente également une forte corrélation positive ( $r^2=0,93$ ) avec une très bonne efficacité.

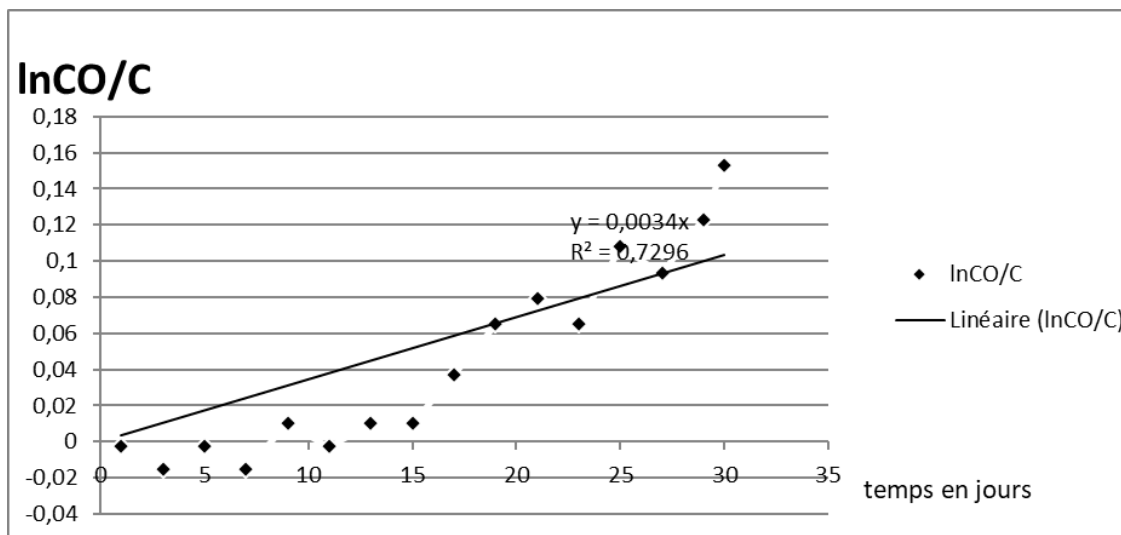


Figure 7. Linéarisation de valeurs progressives de 30 jours : équation de la cinétique du REAt:  $y=0,0034x$ ,  $r^2$ =coefficient de corrélation.

La Figure 7 montre bien que l'efficacité du est nettement inférieure par rapport aux réacteurs inoculés.

Les différentes valeurs présentées dans les Figures 5 à 8 sont résumées dans le Tableau 6 et décrits les constantes cinétiques obtenues pour les réacteurs utilisés.

Tableau 6. Valeurs calculées des constantes cinétiques pour les deux réacteurs inoculés et le témoin

Réacteur	$C_0$ (mg/g de sol)	F/M ratio (mg COT/mgTSS)	$C_b$ (mg)	Constante cinétique "k" ( $j^{-1}$ )	$R^2$
REAi	75.8	5.0	25	0.0345	0.913
REAk	75.8	5.0	25	0.0315	0.935
REAt	75.8	-	0	0.0034	0.729

REAi= réacteur à bactéries indigènes (*Bacillus cereus* et *Enterobacter cloacae*).

REAk= réacteur à bactéries kinoisés (*E. coli* et *Pseudomonas*).

REAt= réacteur témoin non inoculé.

F/M ratio= food-to-microorganisms ratio de l'anglais qui signifie rapport substrat/bactéries.

R= coefficient de corrélation.

TSS= poids sec des microorganismes par gramme dans le sol.

Les résultats de cette étude montrent clairement que le polluant diminue dans le sol à un rythme beaucoup plus rapide grâce à la bioremédiation qui exige à son tour, un certain effort à fournir. Toute taxation de pollution devrait tenir compte de cet effort que l'entreprise fournit et du temps requis pour l'épuration des sites concernés. BARDE [1992] estime que la taxation basée sur le principe pollueur-payeur doit tenir compte de l'effort de dépollution et du temps requis pour ce faire. D'où l'importance capitale de ce model cinétique pour les entreprises qui veulent

réduire leurs redevances à l'Etat par rapport à la pollution des sols par les hydrocarbures.

L'étude cinétique réalisée *in vitro* [ABASSI et WALID, 2007] sur la dégradation des hydrocarbures par la seule bactérie *Stenotrophomonas multophila* a révélé, pour un FM/ratio de 5,0, une constante cinétique de 0,007 par jour ( $r^2=0,71$ ) et de 0,041 par jour ( $r^2=0,92$ ) pour un FM/ratio de 0,5. Il s'avère que la concentration des bactéries est un facteur capital du traitement. Dans cette étude, le couplage des bactéries symbiotiques présente un intérêt confirmé. Ceci nous conduit à encourager le couplage de bactéries agissant en synergie pour augmenter le rendement du traitement.

Les travaux de recherche [HUTCINS et al., 1991] effectués sur la vitesse de dégradation des hydrocarbures ont révélé des constantes cinétiques de 1<sup>er</sup> ordre variant de 0,016 à 0,38/j, selon les types d'hydrocarbures en présence. Les valeurs trouvées dans cette étude sont dans les seuils de celles décrites par ces auteurs et corroborent également celles d'ANTIZAR-LADISLAO et al. [2005] (0,013/j à 30°C) et de HWANG et al. [2001] (0,099/j).

## CONCLUSION GENERALE

Le traitement par la bioremédiation est la voie la plus indiquée pour résoudre de manière holistique le problème de pollution des hydrocarbures.

L'utilisation des plantes pour l'extraction des produits toxiques à partir du sol est passée depuis une dizaine d'années de la phase conceptuelle à la phase commerciale. Les recherches de cette étude ont démontré que les plantes réalisent une bioaugmentation des microorganismes contribuant ainsi à absorber et à dégrader les produits pétroliers. Les faibles coûts associés à la technologie de phytoremédiation ainsi que la possibilité de recyclage de certains métaux expliquent l'intérêt grandissant pour son développement. Nous proposons les plantes supérieures légumineuses à croissance rapide quelle que soit la texture du sol- comme le genre *Acacia*- capables de séquestrer densément le carbone pour en faire d'une pierre deux coups : traiter le sol et l'air.

Cette étude permet, grâce à la cinétique de dégradation bactérienne qu'elle met en place, de prédire la quantité d'huiles épurée et celle encore présente dans le sol à n'importe quel moment sachant seulement la quantité initiale de carbone, les types de bactéries en œuvre et leur biomasse. La recherche a permis ainsi de confirmer le rôle du sol argileux comme barrière au polluant et celui du sol limoneux comme pourvoyeur de bactéries. Le sable permet quant à lui de réaliser le venting naturel et par ce fait d'aérer le sol. Un mélange bien pondéré du limon au sable permet d'optimiser le traitement sur un fond blindé d'argile.

Les objectifs assignés dans cette étude ont été atteints et sont satisfaisants concernant la technique de phyto et bio remédiation des boues ex-réservoir. Cependant, la recherche permet de tirer les conclusions résumées dans les paragraphes qui suivent.

1/ Les indicateurs génériques permettant de prédire la biodégradabilité des hydrocarbures ont été établis. Il s'agit des bactéries et des champignons de l'environnement suivants : *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Fusarium solani* et *Trichophyton sp.* ;

2/ Par des procédés physico-chimiques, la matière polluante a été modifiée (déshydratée et désalée), puis diluée dans le sol suivant un procédé pédologique qui a permis de faciliter le couplage de ces procédés avec l'action des microorganismes (procédé biologique) ;

3/ La stratégie de codigestion des huiles par les différentes espèces était de coupler deux espèces retrouvées déjà en symbiose dans leur milieu d'où elles sont autochtones ;

4/ La cinétique décrite met en exergue l'accélération du processus de dégradation des composés organiques ;

5/ La constante cinétique de premier ordre a été calculée pour déterminer le niveau d'épuration à n'importe quel moment de la période du traitement. Ceci est un déterminant dans l'évaluation du concept pollueur-payeur ou, pour être plus clair, dans la détermination des rédevances imposables pour un développement durable ou une économie verte.

La présence des métaux lourds dans le seuil acceptable pousse à congratuler la SOGIR qui fournit des efforts considérables pour la surveillance de la qualité des produits pétroliers que la RDC importe. Cette étude permet également de confirmer l'hypothèse faite sur l'existence de bactéries et champignons aptes à dégrader aisément les hydrocarbures et qui peuvent subir en revanche les effets mutagènes des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. C'était le cas dans cette étude de quelques colonies d'*Enterobacter cloacae* qui a subi quelques pertes de pouvoir métabolique sur certains sucres au profit d'autres métabolismes notamment celui des hydrocarbures.

Les résultats obtenus révèlent enfin que la boue ex réservoir était toxique à la dose de 25% pour les plantes herbacées alors qu'elle ne l'était pas à la même dose pour les plantes supérieures. Les *Pennisetum* n'ont pas poussé et les *Sorghum* n'ont pas atteint la maturité de croissance.

## RESUME

Les Arénosols couvrent une grande partie de la région d'exploitation pétrolière du bassin côtier en République Démocratique du Congo (RDC). Ces sols sont ainsi soumis à la pollution continue par les déchets d'hydrocarbures. Une

expérimentation en station et *in vitro* a été réalisée afin d'étudier la possibilité de dépollution de sites pollués de la région de Moanda (PERENCO-SOCIR) **par bio-et phyto-remédiation**. A cet effet, une combinaison des microorganismes issus des sites de pollution a été utilisée pour dégrader *ex-situ*, les boues ex-réservoir tenant compte des conditions optimales de vie dans le sol qui sert de diluant. La constante cinétique de premier ordre a été calculée et donne une valeur intéressante de 0,034/jour pour un rapport substrat/microorganismes de 5,0 dans les bioréacteurs. Les bactéries *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* ainsi que les champignons *Trichophyton sp.* et *Fusarium solani* ont été performants dans de grandes concentrations d'hydrocarbures dans le sol. Les plantes légumineuses (*Acacia auriculiformis*) ont présenté un intérêt confirmé tant dans la bioaugmentation que dans la phytodégradation des polluants.

### Mots clés

Exploitation, Phytoremédiation, bioremédiation, biodégradation, pollution et bioréacteurs.

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient sincèrement les autorités responsables de laboratoire de chimie analytique de l'Office congolais de Contrôle (OCC), particulièrement Madame Atosha Mushadira, et de l'Université de Kisangani pour les facilités accordées à la réalisation de certaines analyses de cette étude.

Les remerciements du fond du cœur sont adressés au staff du laboratoire de microbiologie de l'INRB (Kinshasa) pour l'encadrement technique bénéficié lors de travaux de culture, d'isolement et d'identification des microorganismes utilisés dans cette recherche.

Les auteurs sont reconnaissants, à titre posthume, vis-à-vis du responsable du Jardin Expérimental et Elevage des Parcelles (Faculté des Sciences, université de Kinshasa), le Professeur Jacques Paulus pour avoir autorisé la réalisation de l'essai expérimental de cette étude.

### REFERENCES

- ABASSI E.B., WALID D.S. [2007]. Kinetics of indigenous isolated Bacteria used for ex situ bioremediation of petroleum contaminated soil. *American-Eurasian journal of Agricultural & Environmental sciences*, 2,6, 761-766.
- ALEXANDER M. [1999]. Biodegradation and bioremediation, 2<sup>d</sup> edition, 11-15; 98-99, *Academic*, New York.
- ANTIZAR-LADISLO B., LOPEZ-REAL J., BECK J. [2005]. Laboratory studies of the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil by in-vessel composting, *Waste management*, 25, 281-289.
- ATLAS R.M. [1995a]. Bioremediation of petroleum pollutants, *International Biodeterioration & Biodegradation* 35, 1-3; 35,317-327.
- ATLAS R.M. [1995b]. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation, *Marine Pollution Bulletin* 31, 4-12.

- ATLAS R.M., CERMIGLIA C.E. [1995]. Bioremediation of petroleum pollutants, *Bioscience*, 45, pp. 332-338 in ABASSI E. B. et WALID D. S. [2007].
- AZADEH V., EBRAHIM P., MASOUD H.M.B. [2013]. Phytoremediation, a method for treatment of petroleum hydrocarbon contaminated soils, *Intl. J. Farm. Alli. Sci.*, 2, 21, 909-913.
- BAIZE D. [2000]. *Courrier de l'Environnement*, 39-54, INRA, Paris.
- BARATHI S., VASUDEVAN N. [2001]. Utilisation of petroleum hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum contaminated soil. *Environ. Intl.*, 26,413-416.
- BARDE P. [1992]. *Economie et politique de l'environnement*. PUF, 238-239.
- BIDER, HUNT [1982]. in US EPA, [1989]. On site wastewater treatment and disposal systems, Office of water program, Washington, DC.
- BIOMERIEUX. [2001]. *Catalogue analytique API 20 E*. 5<sup>ème</sup> édition Biomérieux S.A., France
- BOELEN S., HANS V., VORGAS C.E., WILSON K.S., KAPTEIN R. [1996]. Structure and dynamics of the DNA binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus* by NMR spectroscopy, *Biomedical and medical physics, biomedical engineering*, Elias Greenbaum, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA.
- BONAVENTURE C., JOHNSON F.M. [1996]. Healthy environment for healthy people. Bioremediation now and tomorrow. *Environmental Health Perspective Supplement*, 105, 5-21
- CEAEQ (Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec) [2011]. Détermination du carbone organique total dans les solides : dosage par titrage, MA. 405-C1.1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 1-9.
- CHAINEAU C.H., MOREL J.-L., OUDOT J. [1995]. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Environmental science & technology*, 29, 1615-1621.
- CHAINEAU C.H., MOREL J.-L., OUDOT J. [1996]. Land treatment of oil-based drill cutting in agricultural soil. *The journal of Environment quality*, vol 25, 858-867.
- FATIMA K., IMRAN A., AMIN I., KHAN I.M., AFZAL M. [2016]. Plant species affect colonization patterns and metabolic activity of associated endophytes during phytoremediation of crude oil-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23 (7), 6188-6196.
- FLOODGATE G.D. [1995]. Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. *Aquatic Microbial Ecology* 9, 3-11.
- HUTCINS S.R., SEWELL G.W., KOVACS D.A., SITH G.A. [1991]. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Enviro. Sci. Technol.*, 25,68-76.
- HWANG E., NAMKOONG W., PARK J. [2001]. Recycling of remediated soil for effective composting of diesel-contaminated soil. *Compost Science and utilization*, 143-149
- ISO. [2006]. Qualité du sol — Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) — Méthode par chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse (CG-SM), ISO 18287:2006, ISO/Comité Technique 190/SC 3, 1ère édition, 18 p.
- LEAHY J.G., COLWELL R.R. [1990]. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305-315.
- MATSODOUM N.P. [2019]. Phytoremédiation de sols pollués par les hydrocarbures – Inventaires floristiques, évaluation des performances des espèces végétales et modélisation du transfert sol-plante des HAP, Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 20 mai 2019, France.

- MOCHALOVA O.S., ANTONOVA N.M., GURVICH L.M. [2002]. The role of dispersants in the processes of oil transformation and oxidation in aquatic environment. *Water Resources*, 2, 202-205.
- NJOKU K.L., AKINOLA M.O., OBOH B.O. [2009]. Phytoremediation of crude oil contaminated soil: the effect of growth of *Glycine max* on the physico-chemical and crude oil contents of soil. *Nature and Science*, 7 (10), 79-87.
- OLESZCZUK P., BARAN S. [2005]. Polycyclic aromatic hydrocarbons content in shoots and leaves of willow (*Salix viminalis*) cultivated on the sewage sludge-amended soil. *Water. Air. Soil Poll.*, 168, 91-111.
- OLIVERA N.L., ESTTEVES J.L., COMMENDATORE M.G. [1997]. Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediment in Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40, 75-79.
- REMON R. [2006]. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse de doctorat, Université Jean Monnet, France.
- SOLTANI M. [2004]. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat, Université Paris 6, France.
- US EPA HPV challenge Program [2010]. Reclaimed petroleum hydrocarbon wastes from petroleum refining. Category assessment document, submitted by Petroleum HPV Testing group Consortium Registration and American Petroleum Institute (API). Washington, DC.



This work is in open access,

licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>