

**IMPACT DE SURFACTANTS BIOLOGIQUES ET DU  
SDS SUR LA MOBILISATION ET LA  
BIODÉGRADATION DES HAP CONTENUS DANS  
UN SOL CONTAMINÉ À LA CRÉOSOTE**

Thèse  
présentée  
comme exigence partielle  
du grade Philosophiae Doctor (Ph.D.)

par

Louise Deschênes

Institut national de la recherche scientifique, INRS-Eau  
2800, rue Einstein, Case postale 7500, SAINTE-FOY (Québec) G1V 4C7

Août 1995

## REMERCIEMENTS

Je désire remercier le docteur Jean-Pierre Villeneuve mon directeur de thèse pour son support moral et son aide financière, également mon co-directeur, le docteur Pierre Lafrance pour avoir dirigé le projet au cours de ces cinq années et pour ses nombreux conseils lors de la rédaction de la thèse et des publications.

Je désire remercier tout particulièrement le docteur Réjean Samson, également mon co-directeur de thèse, pour sa supervision, sa disponibilité et son respect durant la réalisation de la partie expérimentale de mon projet de recherche ainsi que durant les étapes subséquentes.

Je voudrais également remercier Chantale Beaulieu, Stéphane Deschamps, Danielle Ouellette, Sylvie Sanschagrin, Nathalie Matte, Louise Paquet et Alain Corriveau de l'Institut de Recherche en Biotechnologie pour leur support technique et leurs précieux conseils sans lesquels la réalisation de la partie expérimentale du projet de recherche n'aurait pas été menée à bien. Je ne dois surtout pas oublier Manon Leduc de l'Institut de recherche en biotechnologie. Son aide ainsi que l'excellence de son travail ont permis la réalisation du projet de recherche dans un temps raisonnable. Je la remercie donc très spécialement.

Je remercie le docteur Jack T. Trevors de l'Université Guelph pour nous avoir fourni la souche *Pseudomonas aeruginosa* UG2, le docteur Charles W. Greer (Institut de recherche en biotechnologie) pour ses conseils, le docteur Bernard Clément (École Polytechnique de Montréal) pour la réalisation des analyses statistiques, Luc Perreault (INRS-Eau) pour ses conseils judicieux en statistiques et Claude Blanchette (INRS-Eau) pour ses conseils en informatique.

Je voudrais également remercier le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) pour son support financier.

Merci à tous mes amis et amies, Josée Gagnon, Agnès Renoux, Denis Millette, Marie-Paule Otte et France Pelletier pour leurs conseils et leur soutien moral tout au long de la réalisation de ce projet.

Enfin je remercie avec coeur mon partenaire de tous les jours, Stéphan Montambeault, pour sa patience, son encouragement et son soutien moral qui me furent d'une très grande aide pour la réalisation de ce travail.

## RÉSUMÉ

La mobilisation et la biodégradation de 13 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) prioritaires (USEPA) contenus dans un sol contaminé à la créosote ont été étudiées en présence de surfactants dans le but d'évaluer le potentiel réel de ces agents tensioactifs pour la restauration des sites contaminés. L'hypothèse de travail est basée sur le fait que les surfactants peuvent augmenter la solubilisation et la mobilisation des contaminants hydrophobes tels que les HAP et ainsi favoriser leur biodisponibilité. Ceci peut se traduire par un rendement plus élevé de la biodégradation de ces composés. Pour ce projet, deux agents tensioactifs anioniques furent comparés. Le surfactant biologique formé de rhamnolipides a été produit par la souche *Pseudomonas aeruginosa* UG2 préalablement isolée d'un sol contaminé aux hydrocarbures, tandis que l'agent tensioactif chimique a été le sodium dodécyl sulfate (SDS). Le sol utilisé provient d'un site industriel de traitement du bois et son niveau de contamination en HAP totaux est de 3 044 mg/kg. L'utilisation de surfactants biologiques représente un aspect nouveau jusqu'ici peu documenté surtout pour l'étude de la mobilisation et la biodégradation des HAP contenus dans un sol contaminé depuis longtemps.

Pour les expériences de mobilisation, neuf concentrations (0,005 à 1% (p/v)) de chacun des deux agents tensioactifs étudiés ont été utilisées. Le sol contaminé à la créosote a été agité en présence des différentes solutions de surfactants et les HAP contenus dans la phase aqueuse ont été extraits puis analysés. Pour l'expérience de biodégradation dans le sol, trois différentes concentrations de chacun des agents tensioactifs (10, 100 et 500 µg/g) ont été utilisées. Des microcosmes, dans lesquels aucun surfactant n'a été ajouté et d'autres contenant du sol stérilisé, ont respectivement servi de témoins et de contrôles abiotiques. Chacun des traitements a été effectué en trois répétitions pour donner un total de 24 microcosmes. Au début des essais, des nutriments ont été ajoutés et le contenu en eau du sol a été ajusté et maintenu à 80% de la capacité au champ. À chaque semaine, le sol a été mélangé afin de permettre le maintien de conditions aérobies et les quantités d'agents tensioactifs citées ci-haut ont été ajoutées à intervalles de deux semaines, cette séquence d'addition des surfactants permettant une action de ces derniers durant toute la période de traitement. Pendant 45 semaines de traitement, des échantillons de sol ont été prélevés à intervalles réguliers dans chacun des microcosmes. Les HAP ont été extraits à l'aide de dichlorométhane et les concentrations résiduelles ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur sélectif de masse (GC/MS).

Il fut d'abord démontré que dépendamment de la concentration d'agents tensioactifs utilisée, une importante mobilisation des HAP s'est produite en présence des deux surfactants étudiés. Les résultats ont montré que l'augmentation de la concentration des HAP formés de 4 anneaux (pyrène et fluoranthène) dans la phase aqueuse a été plus importante que celle obtenue pour les HAP formés de 3 anneaux. En général, les surfactants biologiques ont davantage augmenté la mobilisation des HAP que le SDS. Par exemple, la concentration aqueuse de pyrène est passée de 43 µg/l (sans surfactants) à 2 807 µg/l et 15 500 µg/l en présence de 0,5% (p/v) de SDS et de surfactants biologiques, respectivement. Ces résultats impliquent qu'une moins grande quantité de surfactants biologiques est requise pour donner la même efficacité que le SDS. Enfin, pour les deux agents tensioactifs étudiés, une augmentation de la concentration de surfactant a eu pour conséquence la mobilisation de HAP de masses molaires élevées très peu solubles dans l'eau, tel que le benzo(a)pyrène.

Il fut également démontré que la biodégradation des HAP dans le sol contaminé à la créosote n'a pas été favorisée par la présence des agents tensioactifs aux trois concentrations étudiées et que le SDS était immédiatement minéralisé par la microflore indigène du sol. Il fut également

démontré que les deux surfactants étudiés ont mobilisé de façon importante les HAP adsorbés dans le sol contaminé. Plus spécifiquement, les résultats ont montré que l'ajout de SDS (à 100 et 500  $\mu\text{g/g}$ ) a significativement diminué (niveau de confiance de 95%) la biodégradation des HAP formés de trois anneaux tels que le fluorène et le phénanthrène. À l'opposé, l'addition des agents tensioactifs biologiques n'a pas eu d'effet significatif sur la biodégradation des HAP formés de trois anneaux. Une diminution plus importante de la biodégradation a été observée dans le cas des HAP formés de 4 anneaux. En effet, à la fois le SDS et les surfactants biologiques (à 100 et 500  $\mu\text{g/g}$ ) ont diminué de façon significative la biodégradation de ceux-ci. Par exemple, après 45 semaines de traitement, la concentration résiduelle du pyrène a été de 29 mg/kg en absence d'agent tensioactif, tandis qu'elle a été de 336, 98 et 28 mg/kg en présence de 500, 100 et 10  $\mu\text{g/g}$  de SDS, respectivement. La diminution de la biodégradation de ces HAP en présence des surfactants biologiques a cependant été moins importante que celle obtenue en présence de SDS. En effet, pour le même exemple, des concentrations résiduelles de 180, 53 et 33 mg/kg ont été obtenues. Pour les autres HAP formés de 4 anneaux (fluoranthène, benzo(a)anthracène et chrysène) des résultats semblables ont été obtenus pour les deux agents tensioactifs étudiés. Les HAP formés de 5 anneaux et plus tels que le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène, le dibenzo(a,h)anthracène, l'indéno(1,2,3-cd)pyrène et le benzo(g,h,i)pérylène, n'ont pas été biodégradés par la microflore indigène du sol.

Tel que prévu, il a été observé que plus la masse molaire du HAP était élevée, plus l'hydrocarbure était récalcitrant. Par ailleurs, les résultats ont également montré que le SDS était biodégradé très rapidement par les microorganismes du sol contaminé. Ces résultats suggèrent que la diminution de la biodégradation des HAP en présence des deux agents tensioactifs a été associée à une utilisation des deux types de composés (HAP et surfactants) comme substrats par la microflore du sol.

En conclusion, la présence des deux agents tensioactifs a eu pour effet d'augmenter la mobilisation des HAP. Ces résultats indiquent que ces surfactants pourraient être utilisés dans les techniques *ex situ* de lavage de sol contaminé ou pour l'extraction *in situ* des contaminants hydrophobes. Cependant, dans l'optique d'un traitement *in situ*, l'augmentation de la mobilisation des contaminants peut contribuer à la dispersion de ces derniers dans la nappe d'eau souterraine et un contrôle efficace du transport des contaminants solubilisés doit être mis en place afin de prévenir la contamination de l'aquifère. Dans le cas d'un traitement *ex situ*, le traitement ultérieur des lixiviats ou des eaux de lavages devient une nécessité avant leur rejet.

D'un autre côté, dans les conditions étudiées, les surfactants n'ont pas été efficaces pour améliorer le biotraitement d'un sol contaminé par les HAP. Cependant, les résultats ont montré la biodégradabilité des surfactants étudiés. Du point de vue pratique et comme l'utilisation de surfactants sur le terrain implique que ces derniers soient biodégradables, des recommandations peuvent être faites à partir des résultats obtenus de la biodégradation des surfactants étudiés. En fait, la biodégradabilité des agents tensioactifs implique que ces derniers devraient être injectés en concentration et selon une séquence d'injection préalablement déterminées lors d'un traitement afin de permettre une action des surfactants durant toute la période de traitement. La biodégradabilité des surfactants implique également qu'il y aura moins de risques d'une contamination ultérieure du site par les surfactants une fois le traitement terminé ce qui est d'un grand avantage dans l'éventualité d'un traitement *in situ*. Finalement, les résultats indiquent que des tests préliminaires sont nécessaires afin de vérifier si la biodégradabilité des surfactants peut interférer avec le processus de biodégradation des composés organiques hydrophobes tels que les HAP. En effet, les surfactants peuvent être utilisés comme substrat préférentiel et ainsi diminuer ou même arrêter la biodégradation des composés plus récalcitrants.

Malgré l'intérêt porté sur la biodisponibilité des contaminants hydrophobes dans les sols, peu de données portant sur l'impact des agents tensioactifs sur la mobilisation et la biodégradation des composés hydrophobes adsorbés dans le sol sont retrouvées dans la littérature. Cependant, la compréhension des différents processus impliqués est d'une importance capitale pour le devenir des biotechnologies environnementales. L'utilisation des surfactants biologiques et surtout d'un sol contaminé depuis un longue période de temps représente un aspect nouveau aux travaux déjà publiés. Les résultats obtenus constituent donc des données importantes tant du point de vue scientifique qu'appliqué.

# DÉFINITIONS

Pour une meilleure compréhension, les définitions de quelques termes utilisés dans le présent document s'avèrent utiles. En effet, on y retrouve les mots surfactant, agent tensioactif et agent émulsifiant. La description de ces termes apparaît ci-après. Ces dernières sont tirées du Larousse (Anonyme 1992) et du Dictionnaire des techniques et technologies modernes (Anonyme 1993).

**Surfactant:** Provient de la contraction de l'anglais "surface active agent". C'est donc un produit qui a la propriété d'agir sur la tension de surface. Le mot surfactif peut également être utilisé comme synonyme. Un surfactant se définit comme étant un produit dont la solution aqueuse présente une concentration plus forte aux interfaces que dans la masse.

**Agent tensioactif:** Produit qui, une fois mis en solution, possède la propriété de modifier la tension superficielle du solvant.

**Agent émulsifiant:** Produit dont la propriété est de former une émulsion.

Pour le SDS et les rhamnolipides produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 qui ont tous deux la propriété de modifier la tension de surface de la phase liquide dans laquelle ils sont dissous, les termes surfactants et agents tensioactifs s'appliquent donc également.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	iii
RÉSUMÉ .....	v
DÉFINITIONS .....	ix
LISTE DES TABLEAUX .....	xv
LISTE DES FIGURES .....	xix
CHAPITRE 1: INTRODUCTION .....	1
1.1 Problématique .....	1
1.2 Objectifs .....	3
1.3 Publication des résultats .....	4
CHAPITRE 2: REVUE DE LITTÉRATURE .....	7
2.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) .....	7
2.1.1 Propriétés .....	7
2.1.2 Sources d'émission .....	9
2.2 Biodégradation des HAP .....	10
2.2.1 Description du processus .....	10
2.2.2 Procédés de biotraitement .....	12
2.2.2.1 Biotechnologies in situ .....	13
2.2.2.2 Biotechnologies ex situ .....	15
2.2.3 Biorestauration de sols contaminés aux HAP .....	17
2.3 Biodisponibilité des HAP .....	17
2.3.1 Adsorption des HAP sur le sol .....	17
2.3.2 Effet de l'adsorption sur la biodégradation .....	18
2.3.3 Utilisation des agents tensioactifs en restauration des sites .....	20
2.3.3.1 Propriétés et rôle des surfactants .....	20
2.3.3.2 Rôle des surfactants biologiques dans la biodégradation des hydrocarbures .....	22
2.3.3.3 Effet des surfactants sur la mobilisation des contaminants .....	24
2.3.3.4 Effet des surfactants sur la biodégradation des contaminants .....	25
2.3.4 Sol contaminé vs sol reconstitué .....	28
2.4 Conclusion .....	29
CHAPITRE 3: MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	31
3.1 Sol .....	31
3.2 Agents tensioactifs .....	34
3.3 Produits chimiques et milieu minéral .....	36
3.4 Tensiométrie .....	37
3.4.1 Estimation de la concentration en surfactants biologiques durant leur production par la souche <i>P. aeruginosa</i> UG2 .....	37
3.4.2 Détermination de la concentration micellaire critique .....	38
3.4.3 Effet de la présence des microorganismes du sol sur les propriétés tensioactives des surfactants .....	38
3.4.4 Effet de la présence du sol stérilisé sur la quantité de surfactants biologiques en solution .....	39
3.5 Respirométrie .....	39
3.6 Minéralisation de composés radioactifs .....	40
3.7 Mobilisation des HAP à partir d'un sol contaminé à la créosote .....	41
3.7.1 Mobilisation des HAP .....	41

3.7.2	Extraction de l'eau du sol .....	42
3.7.3	Micro-extraction liquide-liquide .....	42
3.8	Biodégradation des HAP dans un sol contaminé à la créosote .....	43
3.8.1	Conception du dispositif expérimental .....	43
3.8.2	Extraction en tube des HAP .....	44
3.8.3	Analyses statistiques .....	44
3.9	Analyse des HAP .....	45
CHAPITRE 4:	SURFACTANTS BIOLOGIQUES .....	47
4.1	Introduction .....	47
4.2	Résultats .....	47
4.2.1	Production .....	47
4.2.2	Propriétés .....	50
4.2.3	Effet des microorganismes du sol contaminé sur la propriété tensioactive des surfactants .....	52
4.2.4	Effet du sol stérilisé sur la quantité de surfactants biologiques en solution .....	54
4.3	Discussion .....	56
4.4	Conclusions .....	60
CHAPITRE 5:	DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION DES HAP ...	61
5.1	Introduction .....	61
5.2	Résultats .....	62
5.2.1	Rendement d'extraction .....	62
5.2.1.1	Extraction au fluide supercritique .....	62
5.2.1.2	Méthode en tubes .....	65
5.2.2	Reproductibilité .....	66
5.2.3	Effet des surfactants sur le rendement d'extraction de la méthode en tubes .....	68
5.2.3.1	Analyse de variance .....	68
5.2.3.2	Témoins abiotiques .....	69
5.3	Discussion .....	71
5.4	Conclusions .....	73
CHAPITRE 6:	EFFET DES SURFACTANTS SUR LA MOBILISATION DES HAP ...	75
6.1	Introduction .....	75
6.2	Résultats .....	76
6.3	Discussion .....	84
6.4	Conclusions .....	88
CHAPITRE 7:	EFFET DES SURFACTANTS SUR LA BIODÉGRADATION DES HAP .....	91
7.1	Introduction .....	91
7.2	Résultats .....	92
7.2.1	Présence de microorganismes dégradant les HAP .....	92
7.2.2	Importance de l'addition de nutriments .....	93
7.2.3	Détermination de la fréquence d'addition des surfactants .....	95
7.2.4	Homogénéité du sol de départ .....	97
7.2.5	Effet des surfactants sur la biodégradation des HAP contenus dans le sol contaminé à la créosote .....	99
7.2.5.1	HAP formés de 3 anneaux .....	99
7.2.5.2	HAP formés de 4 anneaux .....	103
7.2.5.3	HAP formés de 5 et 6 anneaux .....	111
7.2.6	Effet du SDS sur la biodégradation du [14C]phénanthrène .....	112
7.2.7	Effet des surfactants sur la consommation d'oxygène du sol .....	114

7.3 Discussion .....	115
7.4 Conclusions.....	123
CHAPITRE 8: PERSPECTIVES POUR LA RESTAURATION DES SOLS ET POUR LA PROTECTION DE L'EAU SOUTERRAINE.....	125
CHAPITRE 9: CONCLUSION GÉNÉRALE.....	129
BIBLIOGRAPHIE.....	133
ANNEXE A.....	141
A.1 Extraction au Soxhlet.....	143
A.2 Extraction au fluide supercritique.....	143
A.3 Analyse des métaux Cu, Cr et As.....	144
A.4 pH.....	144
A.5 Hétérotrophes totaux.....	144
A.6 Contenu en eau.....	145
A.7 Extraction et analyse des ions solubles.....	145
A.8 Rapport C/N.....	146
A.9 Contenu en matières organiques.....	146
A.10 Analyse granulométrique.....	146
A.11 Détermination de la capacité au champ.....	147
A.12 Production des surfactants biologiques de <i>P. aeruginosa</i> UG2.....	148
A.12.1 Préparation de l'inoculum des bactéries ( <i>P. aeruginosa</i> UG2).....	148
A.12.2 Production et purification des surfactants biologiques.....	148
A.12.3 Suivi du glucose, de la tension de surface et de la densité optique durant la production.....	149
ANNEXE B.....	151
B.1 Standards de HAP.....	153
B.2 Standards de récupération.....	156
B.3 Échantillon de sol.....	156
B.4 Méthode de calcul des concentrations de HAP.....	157
ANNEXE C.....	161
C.1 Résultats bruts du chapitre 3.....	163
C.2 Résultats bruts du chapitre 5.....	166
C.3 Résultats bruts du chapitre 7.....	172

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1:	Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires .....	7
Tableau 2.2:	Principaux surfactants biologiques .....	23
Tableau 3.1:	Caractérisation chimique du sol provenant d'un site industriel de traitement du bois .....	32
Tableau 3.2:	Analyse des métaux du sol provenant d'un site industriel de traitement du bois .....	33
Tableau 3.3:	Analyse des ions solubles du sol provenant d'un site industriel de traitement du bois .....	34
Tableau 4.1:	Effet des microorganismes du sol sur la propriété tensioactive des surfactants biologiques .....	52
Tableau 4.2:	Effet des microorganismes du sol sur la propriété tensioactive du SDS .....	54
Tableau 5.1:	Récupération des HAP du sol contaminé à la créosote par trois différentes méthodes d'extraction .....	67
Tableau 5.2:	Récupération des HAP du sol contaminé à la créosote par la méthode en tubes sur 5 échantillons de sol .....	68
Tableau 5.3:	Valeurs de P obtenues lors de la comparaison des concentrations des HAP extraits en présence et en absence des surfactants étudiés .....	69
Tableau 6.1:	Concentrations des HAP de masse molaire élevée retrouvées en phase aqueuse après mobilisation par différentes concentrations de SDS .....	81
Tableau 6.2:	Concentrations des HAP de masse molaire élevée retrouvées en phase aqueuse après mobilisation par différentes concentrations de surfactants biologiques .....	82
Tableau 6.3:	Pourcentages d'enlèvement des HAP contenus dans le sol obtenus en présence de 1% (p/v) de SDS .....	83
Tableau 6.4:	Pourcentages d'enlèvement des HAP contenus dans le sol obtenus en présence de 1% (p/v) de surfactants biologiques .....	83
Tableau 7.1:	Déviations standards relatives obtenues pour les concentrations de HAP dans les 24 échantillons de sol de départ .....	98
Tableau 7.2:	Valeurs de P observées pour la comparaison entre les traitements en présence de surfactants et celui effectué en absence de surfactants (HAP formés de 3 anneaux, 11 semaines de traitement) .....	101
Tableau 7.3:	Taux de biodégradation des HAP formés de 3 anneaux obtenus pour une relation linéaire pour chacun des traitements pour la période de 0 à 2 semaines .....	102
Tableau 7.4:	Taux de biodégradation des HAP formés de 3 anneaux obtenus pour une relation linéaire pour chacun des traitements pour la période de 2 à 7 semaines .....	103
Tableau 7.5:	Valeurs P observées pour la comparaison entre les traitements en présence de surfactants et celui effectué en absence de surfactants (HAP formés de 4 anneaux, 45 semaines de traitement) .....	106
Tableau 7.6:	Taux de biodégradation des HAP formés de 4 anneaux obtenus pour une relation linéaire pour chacun des traitements pour la période de 2 à 11 semaines .....	107
Tableau 7.7:	Taux de biodégradation des HAP formés de 4 anneaux obtenus pour une relation linéaire pour chacun des traitements pour la période de 11 à 45 semaines .....	107

Tableau 7.8:	Pourcentage d'enlèvement des HAP formés de 5 anneaux ou plus par dégradation biologique .....	112
Tableau B.1:	Temps de rétention pour chacun des 16 HAP prioritaires.....	155
Tableau C.1:	Caractérisation chimique du sol provenant d'un site industriel d'entreposage de pétrole (Montréal, sol échantillonné en septembre 1992).....	163
Tableau C.2:	Caractérisation chimique du sol provenant d'un site industriel de traitement du bois (sol entreposé en pile à Delson échantillonné le 30 octobre 1992).....	164
Tableau C.3:	Caractérisation chimique du sol provenant d'un site industriel d'entreposage de pétrole (Montréal, sol obtenu en mars 1993) .....	165
Tableau C.4:	Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE (pression de 400 kPa) pour différentes conditions de température.....	166
Tableau C.5:	Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE (pression de 500 kPa) pour différentes conditions de température.....	167
Tableau C.6:	Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE (pression de 600 kPa) pour différentes conditions de température.....	168
Tableau C.7:	Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE en utilisant différents co-solvants (température de 100°C, pression de 400 kPa).....	169
Tableau C.8:	Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE en utilisant différents co-solvants (température de 100°C, pression de 500 kPa).....	170
Tableau C.9:	Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE en utilisant différents co-solvants (température de 100°C, pression de 600 kPa).....	171
Tableau C.10	Concentrations résiduelles du fluorène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants.....	172
Tableau C.11	Concentrations résiduelles du phénanthrène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	173
Tableau C.12	Concentrations résiduelles de l'anthracène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	174
Tableau C.13	Concentrations résiduelles du fluoranthène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	175
Tableau C.14	Concentrations résiduelles du pyrène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants.....	176
Tableau C.15	Concentrations résiduelles du benzo(a) anthracène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	177
Tableau C.16	Concentrations résiduelles du chrysène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants.....	178
Tableau C.17	Concentrations résiduelles du benzo(b)fluoranthène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	179
Tableau C.18	Concentrations résiduelles du benzo(k)fluoranthène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	180
Tableau C.19	Concentrations résiduelles du benzo(a)pyrène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	181

Tableau C.20	Concentrations résiduelles de l'indéno(1,2,3-cd)pyrène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	182
Tableau C.21	Concentrations résiduelles du dibenzo(a,h)anthracène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	183
Tableau C.22	Concentrations résiduelles du benzo(g,h,i)péрилène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants .....	184

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1:	Structure chimique de quelques HAP .....	8
Figure 2.2:	Fractions obtenues de la distillation du pétrole brut .....	10
Figure 2.3:	Biotraitement de la zone saturée par injection d'eau oxygénée ou de peroxyde d'hydrogène .....	14
Figure 2.4:	Extraction des contaminants et traitement en surface .....	15
Figure 2.5:	Traitement des sols contaminés en biopile statique .....	16
Figure 2.6:	Répartition des contaminants organiques hydrophobes et des agents tensioactifs dans un système sol/eau .....	22
Figure 3.1:	Structure des rhamnolipides produits par <i>P. aeruginosa</i> UG2 et du SDS.....	35
Figure 4.1:	Évolution temporelle de: A) la tension de surface et de B) la concentration en glucose et en surfactants durant la production de surfactants biologiques par la souche <i>P. aeruginosa</i> UG2.....	48
Figure 4.2:	Suivi de la densité optique ( $\lambda = 600$ nm) durant la production de surfactants biologiques.....	49
Figure 4.3:	Détermination de la CMC des surfactants biologiques produits par la souche <i>P. aeruginosa</i> UG2.....	51
Figure 4.4:	Détermination de la CMC du SDS.....	51
Figure 4.5:	Courbe de tension de surface d'une solution de surfactants biologiques (1g/l) seule ou en présence de sol stérilisé (rapport sol/eau 0,5).....	55
Figure 5.1:	Pourcentage de récupération des HAP de 2, 3 et 4 anneaux contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE pour différentes conditions de température et de pression.....	63
Figure 5.2:	Pourcentage de récupération des HAP de 5 et 6 anneaux contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE pour différentes conditions de température et de pression .....	63
Figure 5.3:	Pourcentage de récupération des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE en utilisant différents co-solvants (température: 100°C).....	64
Figure 5.4:	Récupération des HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé par la méthode du Soxhlet et celle en tubes .....	65
Figure 5.5:	Concentrations résiduelles de phénanthrène dans le sol des témoins abiotiques.....	70
Figure 5.6:	Concentrations résiduelles de pyrène dans le sol des témoins abiotiques.....	71
Figure 6.1:	Mobilisation des HAP contenus dans un sol contaminé à la créosote par différentes concentrations de SDS.....	77
Figure 6.2:	Mobilisation des HAP contenus dans un sol contaminé à la créosote par différentes concentrations de surfactants biologiques .....	78
Figure 6.3:	Effet de la concentration de surfactants sur le ratio concentration des HAP dans la phase aqueuse en présence de surfactants/concentration des HAP dans l'eau.....	80
Figure 7.1:	Minéralisation des [ $^{14}\text{C}$ ]HAP dans le sol contaminé à la créosote.....	92
Figure 7.2:	Quantité cumulée d'oxygène consommée par le sol contaminé en absence ou en présence de nutriments (MSM) .....	94
Figure 7.3:	Minéralisation du [ $^{14}\text{C}$ ]SDS dans le sol contaminé à la créosote .....	96

Figure 7.4:	Intermédiaires organiques qui peuvent être formés durant la biodégradation du SDS.....	97
Figure 7.5:	Biodégradation des HAP formés de 3 anneaux dans le sol contaminé à la créosote en absence et en présence de différentes concentrations des deux surfactants étudiés .....	100
Figure 7.6:	Biodégradation des HAP formés de 4 anneaux dans le sol contaminé à la créosote en absence et en présence de différentes concentrations des deux surfactants étudiés .....	104
Figure 7.7:	Concentrations résiduelles (45 semaines) des HAP formés de 4 anneaux dans le sol contaminé à la créosote.....	109
Figure 7.8:	Concentrations résiduelles (45 semaines) de benzo(a)pyrène dans le sol contaminé à la créosote.....	111
Figure 7.9:	Effet du SDS sur la biodégradation du [14C]phénanthrène dans le sol contaminé à la créosote.....	113
Figure 7.10:	Quantité cumulée d'oxygène consommé par le sol contaminé en absence ou en présence de surfactants .....	115
Figure B.1:	Chromatogrammes des standards de HAP à: A) 5 mg/l et B) 50 mg/l.....	154
Figure B.2:	Chromatogramme typique des standards de récupération et du standard d'injection.....	156
Figure B.3:	Chromatogramme typique des HAP extraits d'un échantillon du sol contaminé à la créosote.....	157
Figure B.4:	Courbe étalon du phénanthrène .....	158

# CHAPITRE 1: INTRODUCTION

---

## 1.1 Problématique

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants organiques largement distribués qui ont reçu, durant les dernières années, une attention particulière à cause de leur caractère toxique, cancérigène et mutagène (Menzie et al. 1992). Retrouvés dans des sols industriels et provenant majoritairement de l'activité des industries pétrolières et de préservation du bois, les HAP peuvent atteindre des fortes concentrations, souvent bien supérieures aux critères de contamination, et des démarches sont entreprises pour la restauration des sols contaminés par ces composés. Récemment, plusieurs technologies de restauration ont été proposées afin de traiter les sols. Parmi ces dernières, le traitement biologique qui utilise l'action des microorganismes pour effectuer la destruction des contaminants organiques, présente de grands avantages tels que le faible coût de mise en oeuvre, sa grande simplicité et le respect de l'environnement. À ce sujet, la biodégradation est l'un des processus majeur de dégradation des HAP dans la nature et plusieurs études portant sur la biorestauration des sites contaminés par ces derniers ont été effectuées (Wilson et Jones 1993). Cependant, comme tout autre procédé de restauration, la décontamination biologique présente aussi des limites dues à la biodisponibilité du contaminant dans le sol. En effet, les contaminants organiques hydrophobes et non polaires tels que les HAP tendent à s'adsorber fortement dans le sol et cette propriété semble les rendre moins accessibles à l'attaque des microorganismes. Comme la majorité des réactions d'oxydation effectuées par les bactéries implique le transport du contaminant à l'intérieur de la cellule, les polluants fortement adsorbés deviennent donc plus difficilement assimilables.

Des études récentes ont été menées sur l'effet de l'adsorption des contaminants organiques hydrophobes sur la biodisponibilité de ces derniers et plusieurs d'entre elles ont montré que les taux de dissolution et de désorption des HAP étaient un important facteur qui gouvernait leur taux de biodégradation (Thomas et al. 1986). L'addition d'agents tensioactifs est considérée comme étant une solution au problème en augmentant la solubilisation, la mobilisation et possiblement la biodégradation des contaminants organiques hydrophobes. De récents travaux ont porté sur l'effet des agents tensioactifs sur la mobilisation des contaminants hydrophobes

tels que les HAP (Abdul et al. 1990; 1992) et plusieurs résultats ont suggéré que l'utilisation des surfactants pour la mobilisation des contaminants hydrophobes constituait une voie prometteuse pour la remédiation des sols contaminés. Dans la perspective d'un traitement biologique, des études récentes ont également porté sur l'effet des surfactants sur la biodégradation des HAP. Seulement quelques études sur le sujet ont été effectuées en phase solide et certaines d'entre elles ont démontré que les agents tensioactifs utilisés à de faibles concentrations (10 et 100  $\mu\text{g/g}$ ) pouvaient promouvoir la biodégradation des composés hydrophobes (Aronstein et al. 1991; Aronstein et Alexander 1993; Jain et al. 1992).

Même si l'addition de surfactants semble être une approche prometteuse pour favoriser la biodisponibilité et possiblement la biodégradation des contaminants hydrophobes, l'effet des agents tensioactifs dans le processus de biodégradation demeure cependant obscur. De plus, certaines études montrent même que l'addition de surfactants n'est pas toujours bénéfique (Laha et Luthy 1991; 1992). En fait, plusieurs facteurs peuvent influencer la performance du processus de biodégradation. La disponibilité du contaminant dans les micelles de surfactant et la possible compétition du surfactant (comme substrat pour les microorganismes) avec les contaminants comptent parmi ces facteurs. De plus, les agents tensioactifs synthétiques peuvent affecter la perméabilité de la membrane cellulaire microbienne et ainsi réduire ou complètement éliminer le potentiel de biodégradation des microorganismes impliqués (Hunt et al. 1994). Plusieurs microorganismes produisent des agents tensioactifs qui sont habituellement non toxiques et biodégradables (Parra et al. 1989) et l'utilisation de ces surfactants biologiques constitue une alternative nouvelle qui n'a pas encore été beaucoup étudiée dans le cadre de la décontamination des sols. Certaines études ont démontré leur efficacité dans la promotion de la biodégradation (Hunt et al. 1994; Zhang et Miller 1992) ainsi que dans la mobilisation de certains hydrocarbures (Van Dyke et al. 1993a; 1993b; Scheibenbogen et al. 1994). Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les interactions surfactants/contaminants hydrophobes/microorganismes dans le but d'améliorer le rendement des techniques de biorestauration des sols contaminés.

Enfin, dans la plupart des études qui portent sur le sujet, des composés fraîchement ajoutés sont utilisés et peu de travaux ont été réalisés avec des sols réellement contaminés. Ceci est d'une importance toute particulière puisque, dans les systèmes reconstitués (artificiellement contaminés), les contaminants peuvent ne pas avoir la même biodisponibilité que celle rencontrée dans les sols contaminés depuis longtemps. En effet, une biodisponibilité ou une

biodégradabilité plus restreinte des contaminants adsorbés au sol depuis plusieurs années a été démontrée dans les sols contaminés (Weissenfels et al. 1992; Erickson et al. 1993; Hatzinger et Alexander 1995). Ce phénomène peut s'expliquer par une pénétration profonde des contaminants dans les agrégats de sol, ce qui rend la désorption de ces derniers très lente et difficile (Smith et al. 1989). D'autres facteurs peuvent également être responsables de la non représentativité des résultats obtenus avec des systèmes reconstitués. En effet, la présence d'huiles résiduelles (Boyd et Sun 1990), de différents types de contaminants (métaux lourds, composés organochlorés), ainsi que la présence de différentes souches de microorganismes retrouvées dans les sols non artificiellement contaminés, peuvent influencer la biodégradation des contaminants visés. Finalement, le temps de demi-vie des contaminants est souvent beaucoup plus faible dans les systèmes reconstitués.

Les études portant sur l'effet des agents tensioactifs sur la biodégradation des composés hydrophobes dans les sols ne sont pas très nombreuses et les résultats obtenus sont souvent contradictoires. Certaines études démontrent le potentiel des surfactants à favoriser la biodégradation des contaminants hydrophobes tandis que d'autres montrent que la présence des agents tensioactifs peut nuire à la biodégradation ou simplement ne pas avoir d'effet sur cette dernière. Par l'ambiguïté des résultats, l'action des agents tensioactifs sur la biodégradation des composés hydrophobes est encore un sujet mal connu. Il n'en demeure pas moins que l'étude des facteurs qui gouvernent la disponibilité des polluants organiques dans les sols ainsi que le développement de techniques favorisant la désorption des contaminants pour permettre leur destruction sont des sujets de recherche prioritaires pour le devenir des biotechnologies environnementales (USEPA 1991).

## 1.2 Objectifs

Ce projet a pour but principal de vérifier l'effet de deux agents tensioactifs anioniques sur la mobilisation et la biodégradation de composés très hydrophobes (HAP) contenus dans un sol industriel contaminé à la créosote. L'hypothèse de recherche est basée sur le fait que les surfactants, par leur propriété d'action sur la tension de surface et leur potentiel à augmenter la mobilisation des composés hydrophobes, favoriseraient la biodisponibilité et par conséquent la biodégradation des HAP par les microorganismes du sol. L'utilisation de surfactants biologiques est un concept nouveau et original surtout lorsqu'il s'agit de l'utilisation d'un sol contaminé depuis une longue période de temps. Puisque l'utilisation de surfactants chimiques

pour favoriser la mobilisation des contaminants adsorbés présente un intérêt grandissant, il était également intéressant de comparer entre eux les résultats obtenus avec les surfactants biologiques et ceux obtenus avec un agent tensioactif chimique. Les rhamnolipides produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 ont été choisis comme surfactants biologiques parce que cette souche fut d'abord isolée d'un sol contaminé aux hydrocarbures (MacElwee et al. 1990), parce que ces surfactants ont été bien caractérisés et parce que des résultats ont montré que ces derniers pouvaient augmenter la désorption des HAP (Van Dyke et al. 1993b; Scheibenbogen et al. 1994) ainsi que la biodégradation d'hydrocarbures dans le sol (Jain et al. 1992) lorsqu'ajoutés en faible concentration (100 µg/g). De plus, les glycolipides constituent la classe d'agents tensioactifs biologiques la plus étudiée (Cooper et Zajic 1980). Le surfactant chimique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS), a déjà été étudié pour son utilisation dans les techniques de lavage de sol (Clarke et al. 1992; Roy et al. 1994).

Dans le présent travail, les propriétés tensioactives des deux surfactants ont d'abord été étudiées et comparées. L'effet des surfactants sur la mobilisation des HAP a été vérifié suite au traitement du sol contaminé à la créosote avec différentes concentrations de surfactants et à l'analyse des HAP présents en phase aqueuse. Afin de pouvoir vérifier l'hypothèse de recherche, la biodégradation des HAP adsorbés sur le sol contaminé a été étudiée par le suivi, au cours du temps, des concentrations résiduelles de 13 des 16 HAP prioritaires dans différents traitements avec et sans surfactants. La détermination des concentrations de HAP a été effectuée à l'aide d'une technique GC/MS.

### 1.3 Publication des résultats

Une partie des travaux de cette thèse a été soumise pour publication avec évaluation par les pairs:

Deschênes, L., P. Lafrance, J. P. Villeneuve et R. Samson (1995). The effect of an anionic surfactant on the mobilization and the biodegradation of PAHs in a creosote contaminated soil. *Hydr. Sci. J.*, 40 (4): sous presse.

Deschênes, L., P. Lafrance, J. P. Villeneuve et R. Samson (1995). Surfactant influence on PAH biodegradation in a creosote contaminated soil. Dans: *Textbook from the 3rd Bioreclamation Conference*, R. Hinchee (éd.), San Diego, 24-28 avril (sous presse).

Deschênes, L., P. Lafrance, J. P. Villeneuve et R. Samson (1995). Impact of sodium dodecyl sulfate and *P. aeruginosa* UG2 biosurfactants addition on PAH biodegradation in a weathered creosote contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* (soumis).

# CHAPITRE 2: REVUE DE LITTÉRATURE

## 2.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

### 2.1.1 Propriétés

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comptent parmi les polluants organiques d'importance tant du point de vue environnemental que du point de vue de la santé publique. En effet, ces derniers présentent des caractères cancérigènes, mutagènes ou tératogènes et sont perçus comme étant relativement persistants dans l'environnement (Means et al. 1980; Mihelcic et Luthy 1988b). À cause de leur caractère toxique, l'Agence de Protection Environnementale des Etats Unis (USEPA) a sélectionné, parmi ces derniers, 16 composés comme étant des polluants prioritaires à contrôler dans les effluents industriels (Mihelcic et Luthy 1988a). Le tableau 2.1 présente ces 16 HAP ainsi que certaines de leurs propriétés physico-chimiques.

Tableau 2.1: Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires

HAP	Masse molaire (g)	Solubilité (a,b) (mg/l)	Log K <sub>ow</sub> (b)	Log K <sub>oc</sub> (c)
<b>2 anneaux</b>				
naphtalène	128	31,7	3,37	3,11
<b>3 anneaux</b>				
acénaphthylène	152	3,93	4,07	3,40
acénaphthène	154	3,47	4,33	3,66
fluorène	166	1,98	4,18	3,86
phénanthrène	178	1,29	4,46	4,15
anthracène	178	0,073	4,45	4,15
<b>4 anneaux</b>				
fluoranthène	202	0,26	5,33	4,58
pyrène	202	0,135	5,32	4,58
benzo(a)anthracène	228	0,014	5,61	6,14
chrysène	228	0,002	5,61	5,30
<b>5 anneaux</b>				
benzo(b)fluoranthène	252	0,0012	6,57	5,74
benzo(k)fluoranthène	252	0,00055	6,84	5,74
benzo(a)pyrène	252	0,0038	6,04	6,74
dibenzo(a,h)anthracène	278	0,0005	5,97	6,52
<b>6 anneaux</b>				
indéno(1,2,3-cd)pyrène	276	0,062	7,66	6,20
benzo(g,h,i)pérylène	276	0,00026	7,23	6,20

(a) Dzombak et Luthy 1984; (b) Sims et Overcash 1983; (c) Kerr 1990

Les HAP, constitués de carbone et d'hydrogène, sont composés de deux ou de plusieurs cycles de cinq ou six atomes (composés polycycliques). On y retrouve des noyaux benzéniques, d'où le terme "aromatique". La figure 2.1 présente la structure de quelques HAP formés de 2, 3, 4 et 5 anneaux.

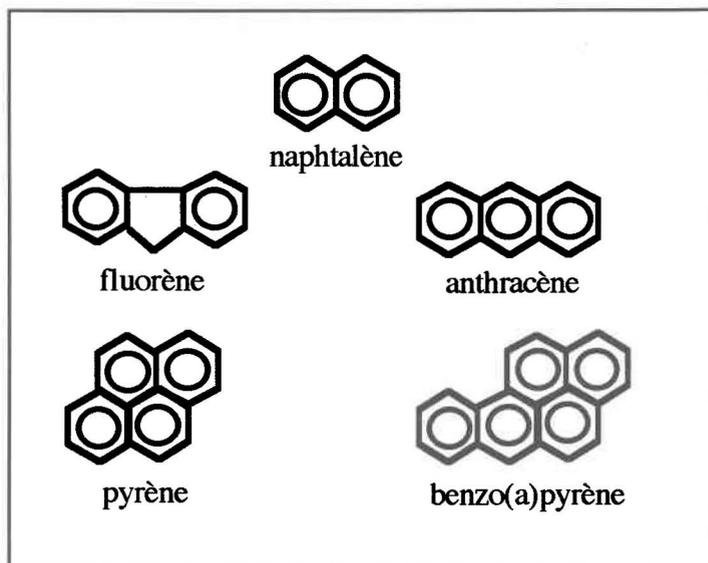


Figure 2.1: Structure chimique de quelques HAP (Dzombak et Luthy 1984).

Les HAP sont des composés non polaires et très hydrophobes. Ces derniers tendent donc à s'adsorber fortement en particulier sur la matière organique du sol (Means et al. 1980). Leur solubilité dans l'eau est comprise entre des valeurs d'environ 32 mg/l pour le naphthalène, 2 anneaux, et moins de 0,001 mg/l pour le benzo(g,h,i)pérylène, 6 anneaux (Dzombak et Luthy 1984). En général, la solubilité des HAP décroît avec l'augmentation du nombre d'anneaux (Sims et Overcash 1983). Il en est de même pour leur volatilité. Les HAP possèdent en général de faibles tensions de vapeur. Puisqu'ils sont des molécules neutres et lipophiles, ils traversent facilement les membranes cellulaires. Jusqu'à aujourd'hui, une centaine de HAP parents et quelques centaines de HAP dérivés ont été dénombrés dans l'environnement (Gonthier 1992).

### 2.1.2 Sources d'émission

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des contaminants organiques largement distribués. En effet, on peut en retrouver dans les particules atmosphériques (Germain et Bisson 1992), dans l'eau, dans les sédiments, dans le sol et dans la chaîne alimentaire (Menichini et al. 1991; Dennis et al. 1991). Les HAP proviennent de la décomposition thermique de tout matériel organique contenant du carbone et de l'hydrogène. Leur formation est basée sur deux principaux mécanismes, soit la pyrolyse ou combustion incomplète et les processus de carbonisation (formation de l'huile minérale ou du charbon) (Bjorseth et Ramdahl 1985). Même s'il existe des sources naturelles de HAP telles que les éruptions volcaniques et les processus de biosynthèse, les sources d'origine anthropique, telles que la combustion du bois d'usage résidentiel, le transport routier et les déversements accidentels de produits pétroliers, sont les plus importantes à cause de leur constance et de leur proximité des zones habitées.

Parmi les sources importantes de la contamination des sols par les HAP, on retrouve le déversement de la créosote utilisée comme agent de préservation du bois. Cette dernière est employée en Amérique du Nord seule ou mélangée avec des hydrocarbures (huile #2) depuis approximativement une centaine d'années (Feenstra et Cherry 1990). Elle est extraite du pétrole brut par distillation (voir figure 2.2).

La créosote est un mélange très complexe de composés organiques. On y retrouve des HAP (dont les principaux sont: phénanthrène, naphthalène, acénaphthène, fluorène, fluoranthène, anthracène et pyrène), des hydrocarbures aromatiques hétérocycliques (N et S) et des composés phénoliques. Quelques fois, des composés aromatiques tels que le benzène, toluène, éthylbenzène et xylène (BTEX) sont également présents. Au moins 200 composés chimiques ont été identifiés dans la créosote. La proportion de ces composés varie selon la source de pétrole ainsi que selon les procédés de fabrication et de raffinage utilisés pour produire la créosote. Notons que des concentrations en HAP (16 HAP prioritaires) variant de 300 à plus de 100 000 mg/kg ont été rapportées dans des échantillons de créosote utilisés par deux industries québécoises de préservation du bois (Lavalin Environnement 1990).

La créosote est utilisée comme pesticide pour augmenter la résistance du bois (piliers de débarcadères, dormants de chemin de fer et bois d'oeuvre). De plus, elle est appréciée pour sa propriété hydrofuge, sa protection contre la corrosion et sa facilité d'application. Les sources de

contamination proviennent des usines de préservation par suite d'émissions atmosphériques, de fuites de réservoir où est entreposée la créosote, de la dilution du produit non retenu dans le bois lors du traitement de ce dernier et enfin d'infiltrations lors de l'entreposage des produits traités (Gonthier 1992). Seulement au Canada, on estime qu'environ 20 000 tonnes de créosote sont utilisées chaque année (Gonthier 1992)

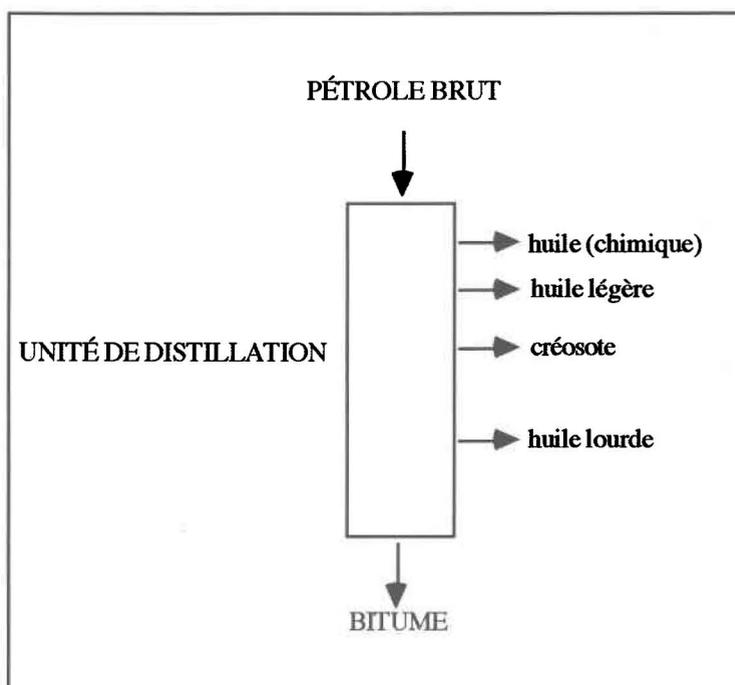


Figure 2.2: Fractions obtenues de la distillation du pétrole brut (Sylvestre 1991).

## 2.2 Biodégradation des HAP

### 2.2.1 Description du processus

La dégradation biologique est l'un des processus majeurs qui affecte la persistance des HAP dans la nature (Wild et Jones 1993; Bossert et Bartha 1986). Par exemple, Park et al. (1990) ont déterminé que ni la volatilisation (négligeable sauf dans le cas du naphthalène), ni les pertes abiotiques par dégradation chimique (potentiellement importantes pour les HAP de 2 ou 3 anneaux) ne participaient significativement au devenir des HAP formés de plus de trois anneaux.

En fait, plusieurs microorganismes possèdent la capacité enzymatique nécessaire à l'oxydation des HAP et ce, même pour des HAP de très haute masse molaire tels que le benzo(a)anthracène et le benzo(a)pyrène (Gibson et al. 1975; Cerniglia et Gibson 1979). En plus des bactéries, les algues et les champignons jouent aussi un rôle important dans la dégradation des HAP (Gibson et Subramanian 1984).

La dégradation microbienne des HAP a été décrite par plusieurs chercheurs (Sims et Overcash 1983; Cerniglia 1984; Smith 1990). En général, les enzymes impliquées sont spécifiques au composé et la présence de différents microorganismes peut être requise pour effectuer la biodégradation de tous les HAP compris dans un site contaminé. Dans la perspective de la restauration des sols, la biodégradation en condition aérobie est celle qui est la plus pratiquée. Sommairement, la dégradation des HAP est initiée par l'incorporation d'oxygène dans les anneaux par des enzymes (oxygénases) produites par les microorganismes. Après cette étape limitante de la réaction, la biodégradation procède de façon plus rapide et l'accumulation d'intermédiaires, s'il y en a, est peu importante (Herbes et Schwall 1978). Le catéchol constitue le composé intermédiaire le plus communément retrouvé. La minéralisation complète des HAP formés de 2 ou 3 anneaux par des microorganismes provenant de sites contaminés qui utilisent ces HAP comme seule source de carbone et d'énergie a été démontrée par plusieurs recherches (Cerniglia 1984; Mueller et al. 1989a; Weissenfels et al. 1990a). Cependant, même si des souches bactériennes capables de dégrader les HAP de masse molaire élevée tels que le fluoranthène (Mueller et al. 1990), le pyrène et le chrysène (Walter et al. 1991) comme seule source de carbone et d'énergie ont été récemment isolées, la biodégradation des HAP formés de 4 anneaux et plus est généralement effectuée par co-métabolisme ou co-oxydation (Sims et Overcash 1983; Sims et al. 1988). Par exemple, Keck et al. (1989) ont observé la co-oxydation de certains HAP (4 et 5 anneaux) lors de l'étude de la biodégradation de 13 HAP dans des sols différents. Les résultats ont montré que les HAP formés de 4 et 5 anneaux étaient biodégradés plus rapidement dans les sols contaminés par des mélanges complexes, tandis que les taux de biodégradation des HAP formés de 3 anneaux n'étaient pas affectés quelle que soit la complexité du mélange de contaminants.

En général, la biodégradation des HAP diminue lorsque le nombre d'anneaux augmente et elle est corrélée positivement avec la solubilité de ces composés (Bossert et Bartha 1986). Par exemple, dans une étude portant sur ce sujet, des temps de demi-vie de 2 jours pour le naphthalène (2 anneaux), de 59 jours pour les HAP formés de 3 anneaux (phénanthrène et

anthracène) et de 300 jours pour les HAP formés de plus de 3 anneaux ont été obtenus selon une cinétique de réaction d'ordre 1 (Park et al. 1990). Des résultats comparables ont été obtenus en laboratoire avec des sols sablonneux (Sims et al. 1988) et avec un sol provenant d'un site de traitement du bois contaminé à la créosote (McGinnis et al. 1988). Dans ce dernier cas, les temps de demi-vie suivants ont été obtenus: moins de 10 jours pour les HAP formés de 2 anneaux, moins de 100 jours pour les HAP formés de 3 anneaux et plus de 100 jours pour les HAP formés de 4 et 5 anneaux.

Enfin, l'acclimatation des microorganismes du sol à la présence des contaminants est aussi un phénomène important observé lors de la biodégradation des HAP. En général, un sol préalablement exposé aux contaminants présente une biodégradation des HAP plus rapide qu'un sol qui ne possède pas d'antécédents de contamination (Heitkamp et Cerniglia 1987).

### **2.2.2 Procédés de biotraitement**

Différentes technologies sont utilisées actuellement pour la restauration des sols contaminés. Parmi ces dernières, les procédés de décontamination par voie biologique constituent une solution qui s'avère à la fois économique, non dommageable pour l'environnement et facile à mettre en oeuvre (Samson et al. 1990). De plus, contrairement à des technologies très utilisées telles que l'encapsulation et la mise en décharge qui sont plutôt des méthodes d'élimination temporaires, le traitement biologique compte parmi les méthodes d'élimination définitive. Les biotechnologies utilisent l'action des microorganismes pour la destruction partielle ou complète des contaminants. Les propriétés des contaminants (solubilité, volatilité, densité) ainsi que les conditions environnementales sont donc très importantes à considérer. La disponibilité du contaminant pour les microorganismes (biodisponibilité) est également l'un des principaux facteurs responsables du succès du traitement, ce facteur faisant partie intégrante de la problématique du présent travail. Les biotechnologies visent essentiellement les contaminants organiques qui sont constitués principalement de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. En général, le processus naturel de biodégradation est accéléré par l'établissement de conditions favorables de température, d'oxygène, de nutriments et de transfert de masse. Le rendement de biodégradation peut également être amélioré par l'ajout de microorganismes (bactéries, champignons) adaptés aux contaminants. En fait, l'utilisation des biotechnologies se répandra dans la mesure où il sera possible de traiter par cette voie des contaminants de plus en plus complexes dans un intervalle de temps acceptable. Les biotechnologies peuvent être divisées en

deux principaux groupes. En effet, dépendamment qu'elles soient appliquées sans déplacement ou après excavation du sol, on retrouve les biotechnologies *in situ* et *ex situ*. Pour les besoins du présent travail, les technologies les plus appropriées pour le traitement des hydrocarbures lourds tels que les HAP sont expliquées plus en détail dans les sections suivantes (source: Samson 1994a; 1994b).

### 2.2.2.1 Biotechnologies *in situ*

Bien qu'elles offrent un potentiel économique et technologique très intéressant, les biotechnologies *in situ* sont moins développées et plus difficiles à mettre en oeuvre que les technologies appliquées après excavation du sol. En effet, les biotechnologies *in situ* sont très dépendantes de la nature du site à décontaminer. La mise en place d'un tel biotraitement requiert donc des conditions géologiques, hydrogéologiques, chimiques et biologiques du site très particulières. Par exemple, les sols argileux possédant une très faible conductivité hydraulique ne peuvent pratiquement pas être traités sans excavation et sans amélioration de la structure du sol. La nature de la contamination demeure aussi un facteur très important à considérer. Par exemple, les contaminants lourds, tels que la majorité des HAP contenus dans la créosote (liquide non aqueux lourd) et qui possèdent une densité plus élevée que celle de l'eau peuvent se retrouver immobilisés dans le fond de l'aquifère et les fractures du roc. Si elles ne sont pas enlevées, ces lentilles de contamination demeurent une source continue de contamination suite à la lente dissolution des contaminants en phase aqueuse. L'enlèvement de ces contaminants piégés dans le roc fracturé demeure encore un défi technologique non totalement résolu. Contrairement aux procédés de traitement *ex situ*, il est difficile dans le cas des traitements *in situ* de démontrer que le sol a atteint un niveau de décontamination acceptable et homogène.

Parmi les procédés de traitement *in situ*, on retrouve: 1) la bioventilation de la zone non saturée; 2) le biotraitement de la zone saturée et: 3) l'extraction *in situ* des contaminants et le biotraitement en surface. La bioventilation de la zone non saturée, qui consiste à stimuler la biodégradation des contaminants par injection d'air, est surtout utilisée pour les contaminants légers tels que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le xylène (BTEX) retrouvés dans l'essence. Pour le traitement des hydrocarbures plus lourds tels que les HAP, les deux derniers traitements énoncés ci haut (biotraitement de la zone saturée et extraction des contaminants) sont plus appropriés.

Le biotraitement de la zone saturée consiste à stimuler, par injection d'air ou de peroxyde d'hydrogène, les populations microbiennes indigènes pour la biodégradation des contaminants (figure 2.3). Il est aussi possible d'injecter des nutriments pour stimuler la biodégradation et des agents tensioactifs pour mobiliser les contaminants. La conductivité hydraulique de l'aquifère, qui conditionnera la récupération de l'eau et des composés, est alors un facteur très important à considérer. Cette méthode est intéressante car elle permet deux mécanismes d'enlèvement, soit la biodégradation *in situ* et la volatilisation des hydrocarbures légers si ces derniers sont présents. Les hydrocarbures volatilisés sont alors captés et traités en surface.

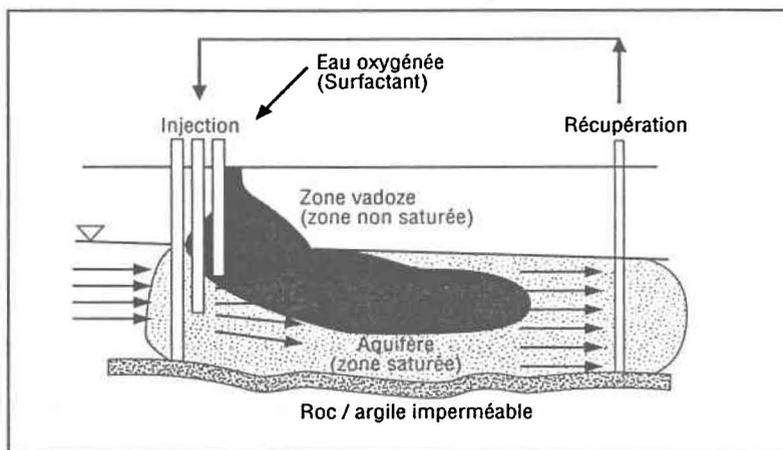


Figure 2.3: Biotraitement de la zone saturée par injection d'eau ou de peroxyde d'hydrogène (Samson 1994b).

Le troisième traitement peut être appliqué lorsque des conditions non favorables au biotraitement *in situ* de la zone saturée sont présentes, telle qu'une grande concentration de contaminants. Il est alors requis d'effectuer la désorption et la mobilisation *in situ* des contaminants afin de traiter ceux-ci dans des bioréacteurs situés en surface (traitement *ex situ*) et dans lesquels les conditions environnementales seront plus faciles à ajuster et à contrôler (figure 2.4). Dans ce dernier traitement, des solutions de surfactants peuvent être utilisées pour faciliter la récupération des contaminants.

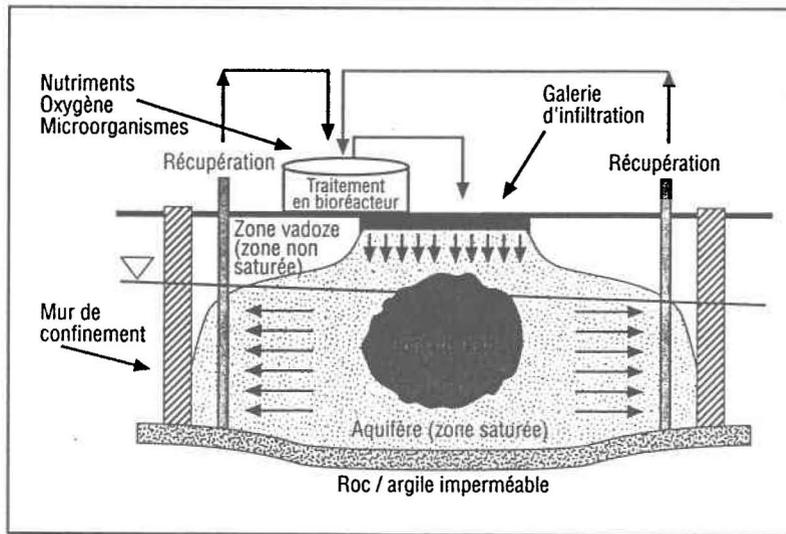


Figure 2.4: Extraction des contaminants et traitement en surface (Samson 1994b).

### 2.2.2.2 Biotechnologies *ex situ*

En comparaison avec le traitement *in situ*, le traitement *ex situ* permet un meilleur contrôle des conditions environnementales. Par exemple, la densité apparente et le niveau de porosité du sol peuvent être améliorés afin de permettre un meilleur transfert de l'oxygène et des nutriments. Parmi les principaux procédés de biotraitement après excavation (*ex situ*), on retrouve: 1) le compostage; 2) l'épandage contrôlé; 3) la bioventilation; 4) la biopile statique et: 5) le traitement en bioréacteur de type "boues activées" et à sol statique. Au Québec, à cause de la quantité maximale d'amendement (10% v/v) permise par le Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF), le compostage n'est pas utilisé. Également et à cause du contrôle difficile des émissions atmosphériques polluantes, l'épandage contrôlé est une technologie peu recommandée par le MEF. Comme la bioventilation *in situ*, la bioventilation *ex situ* est essentiellement utilisée pour la biodégradation et l'extraction des hydrocarbures légers tels que les BTEX. Pour les HAP, le traitement en biopile statique (figure 2.5) et en bioréacteur mélangé sont donc les technologies les plus appropriées.

Dans le traitement en biopile, le sol excavé est placé sur une surface imperméable. Afin de recueillir le lixiviat, cette surface est placée en cuvette de rétention et un drain de récupération est ajouté.

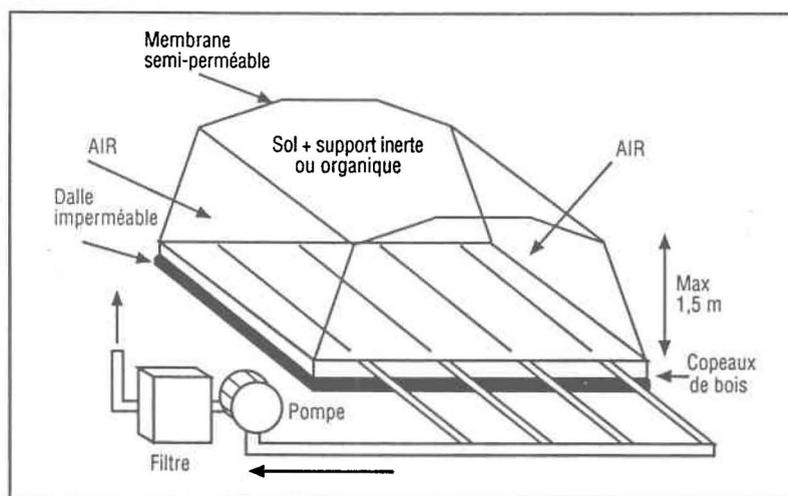


Figure 2.5: Traitement des sols contaminés en biopile statique (Samson 1994a).

Pour minimiser le lessivage des contaminants par l'eau des pluies, une toile imperméable peut être placée sur la pile. Afin d'éviter la compaction du sol et de favoriser l'aération, la hauteur des piles ne dépasse pas 1,5 m. De plus et dépendamment du type de sol utilisé (ex.: argile), la porosité du sol peut être améliorée par l'ajout d'agents structurants. L'oxygénation se fait par aspiration de l'air à travers le sol. Les composés volatils peuvent être captés à l'aide de filtres au charbon activé. Le contenu en eau est maintenu autour de 80% de la capacité au champ du sol et l'ajout de nutriments est effectué afin d'obtenir un rapport C/N/P de 100/10/1.

L'utilisation d'un bioréacteur mélangé pour le traitement des sols contaminés comporte de grands avantages tels que le contrôle facile et le maintien des conditions optimales de biodégradation. Il permet d'assurer l'homogénéité du matériel à traiter et un meilleur contact des microorganismes avec les contaminants, les nutriments et l'oxygène (Wilson et Jones 1993). Cette technologie permet donc de réduire le temps de traitement. Cependant, le traitement de sol en bioréacteur constitue un procédé plus coûteux sans compter qu'un séparateur solide-liquide doit être ajouté s'il y a présence d'une phase liquide. De plus et puisque les normes pour les rejets liquides sont sévères, il y a lieu d'ajouter un système de traitement des eaux contaminées.

### 2.2.3 Biorestauration de sols contaminés aux HAP

Plusieurs études portant sur la biorestauration de sols contaminés aux HAP ont été rapportées (Wilson et Jones 1993). Les résultats obtenus, pour des sols réellement contaminés dans lesquels les HAP sont adsorbés depuis une longue période de temps, montrent en général que les HAP de faible masse molaire (2 et 3 anneaux) sont dégradés assez rapidement, mais que la biodégradation des HAP de masse molaire élevée (4 anneaux et plus) est plutôt limitée (Stroo et al. 1989; Ellis et al. 1991). Par exemple, dans une étude de traitabilité d'un sol contaminé à la créosote à l'intérieur de laquelle 21 HAP furent analysés, plus de 50% des HAP de faible masse molaire ont été biodégradés après une période de 12 semaines de traitement, tandis que peu de perte des HAP plus lourds a été observée (Mueller et al. 1991). Comparativement au traitement *in situ* pour lequel le sol est non remanié, la biodégradation des HAP est améliorée lorsque le traitement s'effectue après excavation du sol (biopile) (Wilson et Jones 1993). Cependant, de meilleurs rendements de biodégradation sont généralement obtenus lorsque le sol est traité en bioréacteur mélangé, ce qui permet un meilleur contrôle de l'aération et du mélange des constituants.

## 2.3 Biodisponibilité des HAP

### 2.3.1 Adsorption des HAP sur le sol

Comme les HAP sont des contaminants organiques hydrophobes, ces derniers tendent à s'adsorber fortement sur les particules de sol. Plusieurs études ont porté sur l'adsorption des HAP dans les sols, ainsi que sur les facteurs qui affectent cette adsorption (Dzombak et Luthy 1984). En fait, moins le HAP est soluble dans l'eau, plus il est hydrophobe, plus son coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ) est élevé et plus il est adsorbé au sol. Des résultats ont montré que la matière organique du sol affectait de façon importante l'adsorption des composés organiques non polaires tels que les HAP (Manilal et Alexander 1991). Par exemple, Karickhoff et al. (1979) ont montré que l'adsorption des HAP augmentait de façon proportionnelle avec le contenu en carbone organique du sol. D'autre part, les résultats obtenus d'une étude portant sur l'adsorption du pyrène, du 7,12-diméthylbenz[a]anthracène, du 3-méthylcholanthrène et du dibenzanthracène sur 14 types de sol différents ont montré que le degré d'adsorption du composé, fortement corrélé avec le contenu en carbone organique, était

indépendant de toute autre propriété du sol (Means et al. 1980). Notons que dans ces deux dernières études, une fonction de régression linéaire a été obtenue entre les valeurs de  $K_{oc}$  (coefficient de distribution carbone organique/eau) et celles de  $K_{ow}$  pour les HAP, ceci pour les différents sols étudiés.

Finale­ment, les résultats d'études portant sur le phénomène d'adsorption des contaminants hydrophobes montrent souvent que l'adsorption présente deux étapes cinétiques (Robinson et al. 1990b). Ainsi, le processus d'adsorption est souvent décrit comme étant la somme d'une étape rapide suivie d'une étape lente. L'étape rapide serait attribuée à l'adsorption des molécules sur des sites accessibles à la surface des particules de sol: l'étape lente serait attribuée à l'adsorption des molécules sur des sites moins accessibles localisés à l'intérieur de la matrice du sol. Il en serait de même pour le processus de désorption. Notons que ce phénomène d'adsorption lente serait responsable de la non représentativité des systèmes reconstitués à l'intérieur desquels les courts temps de contact ne permettraient par une lente diffusion intra-particulaire des molécules.

### **2.3.2 Effet de l'adsorption sur la biodégradation**

Même si les microorganismes nécessaires à la dégradation des HAP sont présents, plusieurs autres facteurs peuvent influencer la biodégradation des contaminants organiques dans un sol. Parmi ces derniers, on retrouve les propriétés intrinsèques du contaminant (voir ci-haut) et les facteurs environnementaux tels que la quantité d'oxygène disponible, la présence de nutriments (N et P), le contenu en eau, le pH et la température. La biodisponibilité du contaminant constitue également un facteur important à considérer et ce, surtout s'il s'agit de contaminants organiques très hydrophobes tels que les HAP. Par exemple et dans le cas des systèmes n'impliquant que la phase liquide, les résultats d'études ont montré que le taux de biodégradation des HAP était contrôlé par le taux de dissolution de ces derniers dans l'eau (Thomas et al. 1986; Stucki et Alexander 1987; Kauser et Maier 1992). De même et en présence d'une phase solide, par laquelle les contaminants hydrophobes se retrouvent fortement adsorbés à la matière organique du sol et aux sédiments (voir ci haut), les HAP adsorbés apparaissent être plus résistants à la biodégradation que les HAP non adsorbés.

En fait, l'adsorption des contaminants hydrophobes joue un rôle très important dans la disponibilité de ces derniers pour les microorganismes. Par exemple, l'effet de l'adsorption sur la biodisponibilité des contaminants hydrophobes a été démontré par la diminution du taux de

biodégradation des HAP suite à l'augmentation de la capacité d'adsorption sur la matrice utilisée (sable, sol + matière organique et puis résine XAD 2) (Weissenfels et al. 1992). D'autres résultats ont également montré un effet similaire (Manilal et Alexander 1991): une diminution du taux de biodégradation du phénanthrène a été observée lorsque la quantité de matières organiques dans les sols était augmentée. Ces auteurs ont suggéré que l'adsorption du phénanthrène sur la matière organique était responsable de cette diminution de la biodégradation. D'autre part, Mihelcic et Luthy (1988b) ont observé que la biodégradation de l'acénaphthène et du naphthalène dans un système sol/eau sous des conditions dénitrifiantes dépendait, entre autres facteurs, des cinétiques de désorption du composé adsorbé dans le sol. De même, les travaux de Al-Bashir et al. (1990) ont montré que la désorption en système sol/eau du naphthalène fraîchement ajouté à deux sols différents diminuait lorsque le contenu organique du sol augmentait: ce contenu contrôlait par ailleurs le taux de minéralisation du substrat. Plusieurs autres études indiquent que l'adsorption ainsi que le taux de désorption des contaminants organiques hydrophobes sont des facteurs qui limitent le taux de biodégradation de ces derniers (Smith et al. 1989; Volkering et al. 1992). À ce sujet, Mihelcic et al. (1993) présentent une revue intéressante de la littérature portant sur la biodisponibilité des composés adsorbés et non adsorbés.

Tout comme les deux types de désorption discutés ci-haut, deux étapes de la cinétique de biodégradation ont été également montrées dans certaines études. Par exemple, Robinson et al. (1990), en étudiant la biodisponibilité du toluène pour la souche bactérienne *Pseudomonas putida* dans un système sol/eau, ont montré qu'une grande partie du toluène ajouté (environ 90%) était d'abord désorbée rapidement et immédiatement biodégradée, alors que la quantité résiduelle de toluène n'était par la suite désorbée et biodégradée que très lentement. Cette deuxième phase de biodégradation du toluène présentait alors un taux limité par la vitesse de désorption.

Finalement, la présence de matières organiques dissoutes peut aussi affecter le taux d'adsorption des contaminants organiques hydrophobes: certains résultats ont montré que les contaminants hydrophobes liés au carbone organique dissous seraient moins biodisponibles (Kukkonen et al. 1990).

D'un autre côté, certains auteurs ont rapporté que la biodégradation des composés organiques hydrophobes pouvait avoir lieu même si ces derniers se trouvaient adsorbés sur une phase

solide. Par exemple, la biodégradation du phénanthrène a été observée dans un sol contenant 40% de matières organiques, ceci malgré l'absence du HAP dans la phase aqueuse (Manilal et Alexander 1991). Les études portant sur la biodisponibilité des contaminants hydrophobes dans les sols ne sont pas très nombreuses et les résultats obtenus sont souvent contradictoires. Certains auteurs présentent le concept du composé adsorbé non biodisponible, alors que d'autres proposent que le composé peut devenir disponible suite à sa lente désorption due à un gradient de concentration. D'un autre point de vue, les interfaces générées par les particules de sol peuvent permettre l'accumulation de certains composés et nutriments qui pourraient stimuler la croissance des bactéries adsorbées sur le sol (Van Loosdrecht et al. 1990). Enfin d'autres auteurs doutent du rôle possible des microorganismes sur la disponibilité du contaminant (Guerin et Boyd 1990; Berg et al. 1990). L'ambiguïté des résultats montre que la biodisponibilité des contaminants hydrophobes dans les sols est un phénomène encore mal connu. Pour le devenir des biotechnologies environnementales, des recherches dans le domaine restent donc à faire afin de mieux connaître les facteurs qui gouvernent la disponibilité des contaminants organiques dans les sols.

### **2.3.3 Utilisation des agents tensioactifs en restauration des sites**

#### **2.3.3.1 Propriétés et rôle des surfactants**

Les agents tensioactifs sont des molécules amphiphiles qui possèdent à la fois une région polaire hydrophile et une région non polaire hydrophobe. Cette caractéristique confère aux surfactants des propriétés bien particulières. En effet, les molécules de surfactants tendent à s'accumuler aux interfaces de deux phases de polarités différentes, et contribuent ainsi à diminuer la tension de surface (interfaces liquide/gas) ou interfaciale (liquide/solide ou liquide/liquide) (Zajic et Seffens 1984). Par exemple, plus la concentration de l'agent tensioactif en solution est élevée, plus la tension de surface est diminuée. Cependant, à une certaine concentration de surfactants, la tension de surface atteint une valeur minimale constante: ainsi à partir d'une certaine valeur de concentration de surfactant, on n'observe plus de diminution significative de la tension de surface. Cette concentration est appelée concentration micellaire critique ou CMC. Lorsque la CMC est atteinte, les interfaces deviennent saturées en surfactant et les molécules de surfactant additionnelles se regroupent sous forme d'agrégats sphériques appelés micelles, et ne contribuent plus ainsi à des modifications au niveau de l'interface. Dans chacune des micelles, la partie hydrophile de la molécule de l'agent tensioactif est orientée vers la phase aqueuse tandis

que la partie hydrophobe, orientée vers l'intérieur de la micelle, crée une région non polaire dans laquelle les composés hydrophobes peuvent s'incorporer. La grandeur de la diminution de la tension de surface ainsi que la valeur de la CMC sont des propriétés intrinsèques à chacun des surfactants. Par ces propriétés, les agents tensioactifs peuvent donc augmenter la solubilité apparente des composés hydrophobes à travers deux processus (Kile et Chiou 1989; Edwards et al. 1994b). Le premier processus implique l'association des régions non polaires des molécules de surfactant avec le composé hydrophobe, ce processus étant dominant à une valeur de concentration en surfactant en dessous de la CMC. L'autre processus, survenant à des concentrations en surfactants au dessus de la CMC, est l'incorporation du composé hydrophobe dans les micelles de surfactant.

À cause de ces propriétés, les agents tensioactifs sont donc très étudiés pour leur utilisation dans différentes technologies de traitement de sol ou de sédiments contaminés par des composés organiques hydrophobes. Dans la perspective de l'application de technologies de restauration utilisant les agents tensioactifs, on retrouve: 1) l'utilisation de surfactants cationiques (très adsorbables sur les argiles chargées négativement) pour l'immobilisation des contaminants hydrophobes; 2) l'utilisation de surfactants anioniques ou non-ioniques pour augmenter la biodisponibilité des contaminants hydrophobes par solubilisation et/ou mobilisation: ceci permet d'augmenter l'aire de contact des contaminants avec les microorganismes, et: 3) la désorption des contaminants hydrophobes durant un lavage du sol par incorporation de ces derniers dans des micelles. Dans de tels systèmes, les surfactants sont distribués dans différentes phases: la figure 2.6 présente la distribution des surfactants ainsi que des contaminants hydrophobes présents simultanément dans un système sol/eau.

En résumé, dans les systèmes sol/eau, les agents tensioactifs peuvent se retrouver sous la forme de monomères en solution, adsorbés sur le sol ou agrégés sous forme de micelle dans la phase liquide. Les contaminants organiques hydrophobes se retrouvent soit à l'état dissous, soit solubilisés par association avec un monomère de surfactant ou par incorporation dans une micelle, soit adsorbés directement au sol ou par l'entremise de l'agent tensioactif adsorbé (Sun et Boyd 1993; Brickell et Keinath 1991). Notons que les recherches portant sur la distribution des contaminants et des surfactants dans les systèmes sol/eau n'ont été que récemment réalisées (Edwards et al. 1992; 1994a; 1994b; Jafvert 1991).

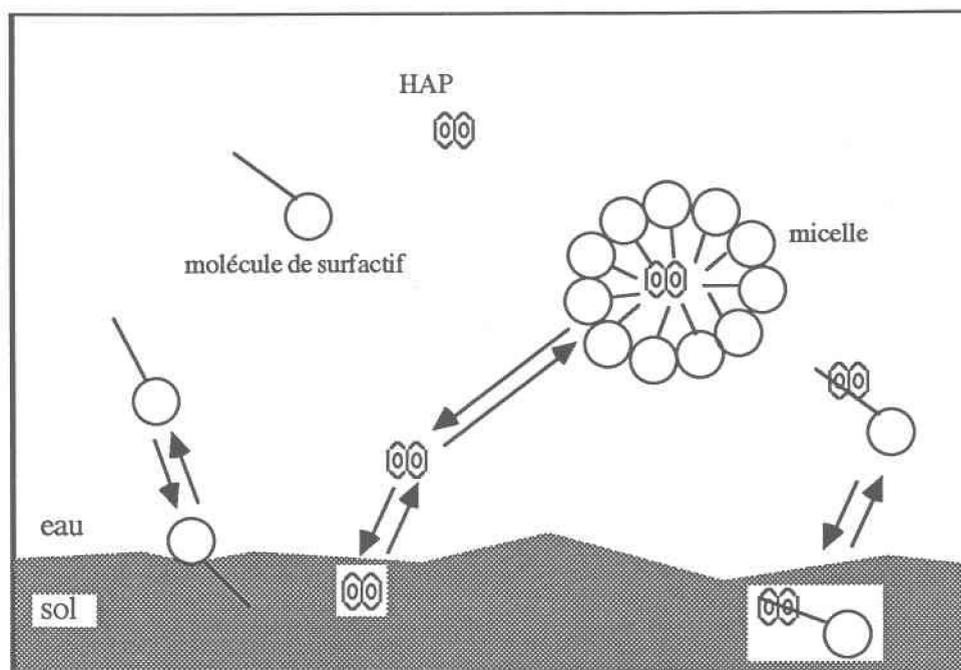


Figure 2.6: Répartition des contaminants organiques hydrophobes et des agents tensioactifs dans un système sol/eau (Adapté de Edwards et al. 1994a).

Finalement, la dégradabilité du surfactant est également un facteur important à considérer en restauration des sites contaminés. Par exemple, si une application de surfactant est effectuée *in situ*, une contamination ultérieure causée par la présence de l'agent tensioactif doit être évitée. L'agent tensioactif injecté ne doit pas ainsi présenter une persistance élevée dans le sol.

### 2.3.3.2 Rôle des surfactants biologiques dans la biodégradation des hydrocarbures

Les microorganismes peuvent produire des agents tensioactifs communément appelés surfactants biologiques. Ces derniers sont excrétés dans le milieu ou se retrouvent associés à la membrane cellulaire des microorganismes. Le type, les propriétés et la quantité de surfactants biologiques produite dépendent de la souche bactérienne et de la source de substrat utilisées (Parkinson 1985). Bien souvent, plus d'un seul type de surfactant est produit et c'est pourquoi il est difficile d'en définir les propriétés. Le groupe hydrophobe le plus commun est une chaîne

hydrocarbonée aliphatique saturée ou un acide gras tandis que la partie polaire ou hydrophile est formée par une variété de groupes fonctionnels. Par exemple, on retrouve les phosphates dans les phospholipides, les sucres dans les glycolipides, les esters et les alcools dans les lipides neutres (Zajic et Seffens 1984). En fait, il existe six classes majeures de surfactants biologiques dont la principale est celle des glycolipides (Kosaric et al. 1983; Parkinson 1985; Zajic et Seffens 1984). Le tableau 2.2 présente ces différentes classes de surfactants biologiques ainsi que des exemples de microorganismes qui les produisent.

Tableau 2.2: Principaux surfactants biologiques

Classes	Principaux surfactants	Caractéristiques	Microorganismes
1- glycolipides	tréhaloses di-	extracellulaire	<i>Mycobacterium</i>
	mycolates		
	rhamnolipides	extracellulaire anionique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	sophorolipides	extracellulaire anionique ou non-ionique	<i>Torulopsis</i>
2- lipopolysaccharides	émulsan <sup>(a)</sup>	extracellulaire polyanionique	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
3- lipopeptides	surfactine ou subtilisine	extracellulaire non-ionique	<i>Bacillus subtilis</i>
4- phospholipides		peu extracellulaire	<i>Thiobacillus thiooxydans</i>
5- acides gras et lipides neutres		souvent extracellulaire	
6- surface cellulaire			

(a) L'émulsan est un agent émulsifiant

Jusqu'à maintenant, le rôle de la production de surfactants biologiques n'est pas bien compris, mais cette dernière (surtout la production de glycolipides) est souvent associée à la biodégradation des composés organiques hydrophobes tels que les hydrocarbures (Hommel 1990). Par exemple, les résultats d'une étude ont montré que des mutants d'une souche de *P. aeruginosa*, ayant perdu la capacité de produire des rhamnolipides (glycolipides) extracellulaires, ne pouvaient plus minéraliser l'hexadécane ou croître en présence de différents alcanes (C<sub>12</sub> à C<sub>19</sub>) (Koch et al. 1991). Par contre, lorsqu'une quantité de rhamnolipides était ajoutée dans le milieu, la capacité de dégradation et de croissance des mutants était rétablie. Dans une autre étude, Oberbremer et Müller-Hurtig (1989) ont observé deux étapes lors de la biodégradation d'un mélange d'hydrocarbures dans un réacteur contenant 10% de sol (système sol/eau). Dans

la première phase, seul le naphthalène, l'hydrocarbure le plus soluble parmi ceux présents, a été biodégradé. Durant la deuxième étape, une diminution de la tension de surface du milieu provoquée par la production de surfactants (glycolipides) par les microorganismes contenus dans le réacteur s'est d'abord produite, puis les hydrocarbures plus hydrophobes ont alors été dégradés. Ces études montrent donc qu'il pourrait y avoir une relation entre la production d'agents tensioactifs biologiques et l'assimilation des hydrocarbures, ce qui explique un intérêt grandissant pour leur possible utilisation dans la biorestauration des sites contaminés. De plus et dans l'optique de technologies de restauration, l'utilisation des surfactants biologiques peut présenter certains avantages en comparaison avec celle des surfactants synthétiques tels que leur biodégradabilité, leur diversité structurale, leur efficacité (activité tensioactive) dans des conditions extrêmes de température, de pH et de salinité, leur non toxicité potentielle pour les microorganismes, et la possibilité d'une production *in situ*, ce qui permettrait de réduire les coûts de traitement. Néanmoins, plusieurs recherches restent à faire dans le domaine avant de démontrer l'intérêt réel de l'utilisation d'agents tensioactifs biologiques en biorestauration des sols contaminés.

### 2.3.3.3 Effet des surfactants sur la mobilisation des contaminants

Dans des travaux récents, plusieurs surfactants ont été étudiés afin d'évaluer leur efficacité potentielle à mobiliser les contaminants organiques hydrophobes adsorbés dans le sol (Abdul et al. 1990; Abdul et Gibson 1991; Ang et Abdul 1991; Laha et Luthy 1992; Aronstein et al. 1991). Les résultats suggèrent que l'utilisation des agents tensioactifs pour la mobilisation des composés hydrophobes présents dans un sol est une voie prometteuse pour la remédiation des sols contaminés. En fait, plusieurs études effectuées en laboratoire ont montré l'efficacité des surfactants à augmenter la désorption et la mobilisation de HAP préalablement ajoutés au sol (Edwards et al. 1991; 1992; Liu et al. 1991; Pennell et al. 1993). D'autres études ont été menées en utilisant des sols contaminés provenant de sites industriels (Ellis et al. 1991). Dans les deux cas, la concentration des contaminants retrouvés dans la phase aqueuse était toujours plus élevée en présence de surfactants. Dans la plupart des études, des agents tensioactifs non-ioniques ont été utilisés: cependant, certaines études ont utilisé des surfactants anioniques. Parmi ces derniers, le SDS est l'un des plus connus et certains travaux ont été réalisés pour évaluer son efficacité à solubiliser les contaminants hydrophobes. Par exemple, le SDS en concentrations supérieures à la valeur de sa CMC a été efficace pour la mobilisation de l'anthracène contenu dans une colonne de sable préalablement contaminé avec le HAP (Roy et

al. 1994). Dans une autre étude, le SDS a été utilisé pour un projet de démonstration de technologie de lavage du sol à l'échelle pilote (Clarke et al. 1992). L'unité de traitement incluait la recirculation et la réutilisation du surfactant, une approche importante pour arriver à la rentabilité du procédé. Des essais de lavage de sol *in situ* utilisant les agents tensioactifs ont même été réalisés (Abdul et al. 1992). D'autres recherches sont en cours dans le but d'optimiser l'efficacité de lavage des sols à l'aide de différents surfactants seuls ou en mélange (Martel et al. 1993).

Des études ont également porté sur la mobilisation des contaminants hydrophobes par les surfactants biologiques (Falatko et Novak 1992; Juwarker et al. 1993). Pour divers travaux, des résultats prometteurs ont été montrés. Un des exemples pratiques des plus intéressants de l'utilisation des surfactants biologiques dans le lavage des sols fut l'enlèvement, à l'aide des surfactants produits par la souche *P. aeruginosa* SB30, des huiles déversées par l'Exxon Valdez sur les plages devenues contaminées (Harvey et al. 1990). Les rhamnolipides produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 ont été étudiés dans des systèmes où les contaminants étaient préalablement ajoutés dans le milieu. Dans de tels systèmes et en phase sol/eau, les résultats ont montré une augmentation de la concentration du naphthalène, du phénanthrène, du fluorène, de l'hexachlorobiphényle et du tétrachlorobiphényle en phase aqueuse à mesure que la concentration de surfactants biologiques était augmentée (Van Dyke et al. 1993b). Dans une autre étude, les rhamnolipides de même origine ont été comparés à 12 autres surfactants biologiques pour leur efficacité à solubiliser l'hexachlorobiphényle: les meilleurs résultats ont été obtenus avec les rhamnolipides produits par cette souche *P. aeruginosa* UG2 (Van Dyke et al. 1993a). Enfin, les rhamnolipides produits par cette souche *P. aeruginosa* UG2 ont été étudiés pour leur efficacité à mobiliser un mélange d'hydrocarbures (aliphatiques et aromatiques) à partir d'une colonne de sol (Scheibenbogen et al. 1994): les résultats suggèrent que ces agents tensioactifs biologiques présentent un potentiel intéressant pour la remédiation des sols contaminés par des composés organiques hydrophobes.

#### **2.3.3.4 Effet des surfactants sur la biodégradation des contaminants**

L'effet des agents tensioactifs sur la biodégradation des HAP a fait l'objet d'études récentes (Rouse et al. 1994). Des travaux sur le sujet ont été réalisés en phases liquide, sol/eau et solide, certains avec des surfactants chimiques, d'autres avec des surfactants biologiques. Dans ces études, des surfactants non-ioniques et anioniques ont été utilisés. Plusieurs résultats ont

montré que l'ajout de surfactants est susceptible d'augmenter la biodégradation des hydrocarbures: cependant, d'autres résultats indiquent que les agents tensioactifs n'affectent pas ou peuvent même nuire à la biodégradation (voir ci-après). En fait, des recherches sont nécessaires pour élucider le rôle des surfactants dans le processus de biodégradation des contaminants organiques hydrophobes.

En milieu liquide, plusieurs études ont montré que la présence de surfactants non-ioniques pouvait augmenter la biodégradation des hydrocarbures (Guerin et Jones 1988; Burry et Miller 1993; Thai et Maier 1992). Par exemple, le taux de biodégradation du phénanthrène a été augmenté par la présence de quatre surfactants chimiques (Triton X-114, Brij 35, Tween 40 et Corexit 0600) et ceci à de faibles concentrations de surfactants, inférieures à la CMC (Kausser et Maier 1992). Les auteurs ont attribué cette promotion de la biodégradation à l'augmentation du taux de dissolution du HAP en présence des agents tensioactifs. De même, une augmentation de la biodégradation et de la croissance de microorganismes en présence de plusieurs hydrocarbures aromatiques (étudiés un à la fois) tels que le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène, a été observée lors de l'ajout de divers agents tensioactifs non toxiques (Tiehm 1994). D'un autre côté, la biodégradation du phénanthrène a été interrompue par la présence de SDS. L'auteur interprète les résultats obtenus à travers l'hypothèse d'une utilisation du SDS comme substrat préférentiel par les microorganismes.

En présence de sol, l'addition de faibles concentrations ( $10 \mu\text{g/g}$ ) de surfactants non-ioniques (Alfonic 810-60 et Novel II 1412-56) a augmenté de façon importante la minéralisation du phénanthrène dans un sol présentant un contenu en eau égal à 70% de sa capacité au champ (Aronstein et al. 1991; Aronstein et Alexander 1992). Des résultats semblables ont été obtenus lors de la mise en circulation d'une solution du surfactant Novel II ( $10$  et  $100 \mu\text{g/l}$ ) dans des colonnes de sol et ce, même sans augmentation apparente de la concentration de phénanthrène dans l'eau (Aronstein et Alexander 1993). Le mécanisme par lequel les agents tensioactifs ont augmenté la minéralisation du contaminant, sans avoir pour autant favorisé sa désorption, n'a cependant pas été expliqué. D'autres études ont également montré l'augmentation de la biodégradation d'hydrocarbures en présence de surfactants (Ducreux et al. 1994; Rittmann et Johnson 1989). À l'opposé, en système sol/eau, l'addition de surfactants non-ioniques (différents éthoxylates et Tween) à des concentrations inférieures à la CMC n'a pas affecté la biodégradation du phénanthrène, tandis que pour des concentrations supérieures à la CMC ( $0.01$  à  $1\%$  (v/v)) la biodégradation du phénanthrène a été complètement arrêtée (Laha et Luthy 1991;

1992). Puisque cet arrêt de la biodégradation a été levé (reprise de la biodégradation) lorsque les agents tensioactifs ont été dilués à des concentrations inférieures à la CMC, les auteurs ont expliqué les résultats obtenus par la non disponibilité, pour les microorganismes, du contaminant incorporé dans les micelles. Dans une perspective similaire, Rasiah et Voroney (1993) ont employé six surfactants et les résultats ont montré que seulement deux agents tensioactifs, un anionique et un non-ionique, pouvaient être efficaces pour l'augmentation des taux de biodégradation de résidus huileux dans un sol.

En milieu liquide, l'utilisation de surfactants biologiques a aussi fait l'objet d'études. Les rhamnolipides produits par les souches de *P. aeruginosa* comptent parmi les agents tensioactifs biologiques les plus étudiés. Des études ont montré que ces surfactants biologiques pouvaient améliorer la mobilisation et la biodégradation d'hydrocarbures hydrophobes tels que le phénanthrène (Hunt et al. 1994) et l'octadécane (Zhang et Miller 1992). D'un autre côté, la biodégradation d'hydrocarbures tels que l'hexadécane et le pristane a été diminuée de 50% à 90% suite à un prétraitement à l'émulsan (Foght et al. 1989), un surfactant biologique produit par *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 et très utilisé pour la récupération des huiles (Rosenberg et al. 1979). Dans ce cas, les auteurs ont suggéré, comme explication, une inhibition de l'adhésion des microorganismes sur l'huile émulsifiée par la présence d'émulsan. Une autre étude a montré des résultats semblables: une inhibition de la biodégradation de l'hexadécane en présence d'un surfactant chimique (Triton X-100) a été expliquée par une interférence du surfactant avec l'interaction directe entre les cellules microbiennes et le substrat (Efroymson et Alexander 1991).

On a observé que dans un réacteur contenant 10% de sol (système sol/eau), l'addition de sophorolipides (200 mg/l), un agent tensioactif biologique de la classe des glycolipides, a augmenté le taux de biodégradation d'un mélange d'hydrocarbures (C<sub>14</sub> à C<sub>18</sub>) et de naphthalène (Oberbremer et al. 1990). Après avoir facilité la dégradation des contaminants, les surfactants ajoutés ont ensuite été dégradés par les microorganismes du milieu. Finalement, l'addition de 100 µg/g de surfactants biologiques de *P. aeruginosa* UG2 partiellement purifiés dans un sol présentant un contenu en eau de 25% a augmenté la biodégradation, par la microflore indigène, d'hydrocarbures aliphatiques tels que le tétradécane, l'hexadécane et le pristane (Jain et al. 1992). Cependant, la biodégradation dans le milieu de l'hydrocarbure aromatique qui possédait la plus grande solubilité de tous les composés ajoutés (2-méthyl-naphtalène) ne fut pas affectée par la présence de ces agents tensioactifs biologiques.

### 2.3.3 Sol contaminé vs sol reconstitué

La presque totalité des études portant sur la biodisponibilité des HAP dans le sol ou sur l'effet des surfactants sur la biodégradation des contaminants ont été réalisées en présence de systèmes reconstitués (artificiellement contaminés) et non dans des sols contaminés depuis une certaine période de temps. L'utilisation d'un sol reconstitué, quoique très pratique d'un point de vue technique, présente certains problèmes quant à la représentativité du système par rapport à un sol contaminé. En effet, un sol contaminé fait intervenir différents éléments qui sont importants à prendre en compte lors de l'étude de la biodégradation de contaminants dans un sol. Les paragraphes suivants expliquent les principaux processus impliqués.

Tout d'abord, dans les systèmes reconstitués, les contaminants sont fraîchement ajoutés dans le milieu et la biodisponibilité du contaminant peut ne pas être la même que celle retrouvée pour un contaminant qui a été en contact avec le sol durant une certaine période de temps. En fait, les sols contaminés depuis un certain temps possèdent ce que l'on appelle des résidus âgés. Ces derniers sont formés par trois différents processus soit par: 1) la lente diffusion des contaminants dans la matière organique du sol; 2) la lente diffusion des contaminants dans les petits pores des agrégats de sols et: 3) l'adsorption des contaminants sur le sol qui implique les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes. Parmi ces derniers, il est à noter que les deux premiers cas constituent les principaux processus impliqués. La formation des résidus âgés fait appel uniquement à des processus physiques, cette dernière n'impliquant aucune transformation chimique du contaminant telle que la polymérisation ou la formation de liaisons covalentes entre les contaminants et la matière organique du sol. Selon des études récentes, ces résidus âgés possèderaient une désorption lente et difficile (Smith et al. 1989) donc une biodisponibilité plus faible que celle retrouvée pour les contaminants fraîchement ajoutés. Par exemple, une biodégradabilité et une extractabilité plus restreintes des hydrocarbures contenus dans un sol depuis une longue période de temps ont été montrés; celles retrouvés pour les mêmes contaminants en contact avec le même sol pour une période de temps plus courte étant beaucoup plus élevées (Hatzinger et Alexander 1995). Enfin, des temps de biodégradation beaucoup plus long sont également retrouvés dans les sols contaminés.

Un sol contaminé fait également intervenir différents contaminants à la fois. En effet, un sol peut contenir par exemple, des huiles résiduelles, des HAP, du pentachlorophénol, des métaux. il y a donc interaction de ces contaminants entre eux et cette dernière peut influencer la

biodégradation de chacun des contaminants. Par exemple, certains contaminants tels que les métaux, peuvent être toxiques pour les microorganismes du sol. Au contraire, dans les sols reconstitués, un seul ou très peu de contaminants se retrouvent présents à la fois et les concentrations des contaminants sont également différentes. En effet, des concentrations souvent beaucoup plus faibles et non représentatives des sols contaminés sont utilisées. L'activité de la microflore du sol peut donc être bien différente que celle retrouvée dans des sols où des concentrations beaucoup plus élevées en contaminants sont présentes.

Enfin, un sol contaminé depuis une certaine période de temps fait intervenir différents microorganismes qui sont en interaction entre eux. En fait, tout un écosystème adapté à une certaine contamination est en place, un équilibre biologique est donc établi. Différentes populations se sont développées et un sol contaminé fait donc appel à différentes souches bactérienne toutes présentes à la fois. Par rapport à un système dans lequel une seule souche est ajoutée, un sol contaminé va faire intervenir différentes réactions qui ne seraient pas présentes dans le premier système surtout si la biodégradation d'un contaminant peut faire appel à un consortium bactérien.

## 2.4 Conclusion

Les HAP constituent des contaminants d'importance qui se retrouvent en concentrations élevées dans divers sites industriels tels que ceux liés à la préservation du bois. Dans le but de restaurer les sols contaminés par ces polluants, les procédés de décontamination par voie biologique s'avèrent être une solution intéressante; la biodégradation des HAP constituant l'un des processus majeur de l'atténuation naturelle de ces contaminants dans la nature. Cependant, les HAP sont des contaminants très hydrophobes et ils se retrouvent fortement adsorbés sur le sol. Diverses études ont montré une diminution et même l'arrêt de la biodégradation des contaminants hydrophobes par suite de leur adsorption dans le sol.

L'utilisation des surfactants en restauration des sites présente une solution éventuelle au problème de la biodisponibilité des contaminants hydrophobes. Les surfactants montrent en général une bonne efficacité pour la mobilisation des contaminants adsorbés sur le sol. Dans la perspective d'améliorer le traitement biologique des composés hydrophobes, des travaux récents ont étudié l'impact des surfactants sur la biodégradation des contaminants organiques tels que les HAP. Certains résultats ont montré que des surfactants, utilisés à de faibles concentrations (10

et 100  $\mu\text{g/g}$ ), pouvaient améliorer la biodégradation des contaminants dans un sol. À l'opposé, d'autres études ont montré que les surfactants n'avaient pas d'effet et même pouvaient nuire à la dégradation biologique des composés organiques. En fait, peu d'études sur le sujet ont été effectuées jusqu'à maintenant et l'effet des surfactants sur la biodégradation des contaminants hydrophobes n'est pas bien compris indiquant ainsi un important besoin de recherche dans le domaine. De plus, la plupart de ces études ont été effectuées dans des milieux reconstitués dans lesquels les contaminants préalablement ajoutés ne sont pas adsorbés aussi fortement sur le sol que ceux présents dans des sols depuis plusieurs années. Afin de mieux comprendre l'effet des surfactants sur la biodégradation des composés hydrophobes et de développer des technologies environnementales efficaces, des études supplémentaires sont donc nécessaires.

## CHAPITRE 3: MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

Le présent chapitre décrit le matériel ainsi que les principales manipulations qui ont été effectuées pour la réalisation des expériences. Pour les autres méthodes qui ne figurent pas dans ce chapitre, une description précise des méthodes d'acquisition de données (protocoles, instruments, etc) est jointe en annexe.

### 3.1 Sol

Pour les expériences qui doivent être effectuées dans le cadre du présent projet, le choix du sol constitue une étape importante pour l'obtention de résultats concluants. Tout d'abord, le sol doit contenir une contamination assez élevée de chacun des 13 HAP prioritaires étudiés afin de pouvoir vérifier l'effet de la présence des surfactants étudiés sur la biodégradation de ces HAP. En effet, si la concentration en HAP au départ n'est pas très élevée, il sera donc difficile d'obtenir des différences significatives entre les traitements effectués. En deuxième lieu, le sol doit contenir également une microflore apte à la biodégradation des HAP. En effet, si les contaminants étudiés ne sont pas biodégradés, aucune conclusion ne pourra être tirée en ce qui concerne l'impact des surfactants étudiés sur la biodégradation de ces HAP. Différents sols ont donc d'abord été caractérisés afin de procéder à la sélection du sol approprié. Les résultats de la caractérisation des différents sols sont présentés en annexe. Selon les critères de sélection énoncés ci-haut, les sols présentés en annexe n'ont pas été choisis du fait que la contamination en HAP s'est révélée trop faible.

Le sol qui a été sélectionné pour toutes les expériences effectuées dans le présent travail provient d'un site industriel de préservation de bois en opération depuis de plus de 20 ans situé à Delson, Québec. Le sol a été échantillonné près des autoclaves dans lesquels le bois à traiter est trempé dans la solution de préservation (créosote) et soumis à des séquences de vide/pression afin d'assurer à la fois une bonne pénétration et une bonne rétention du préservatif. Le sol est donc contaminé depuis plusieurs années par des fuites de créosote produites à la sortie des autoclaves. Le sol était de couleur brun foncé à noir et à certains endroits, des mares de créosote étaient présentes en surface. Une odeur assez forte de créosote se répandait un peu partout à l'endroit d'échantillonnage. Le sol en surface a été enlevé et un échantillon de sol (approximativement 20 kg) a été recueilli à une profondeur de 5 à 30 cm à la sortie des autoclaves. L'échantillonnage s'est fait en un seul point.

Le sol a ensuite été tamisé à 2 mm en laboratoire, homogénéisé et gardé à 4°C à l'obscurité jusqu'à son utilisation. Une série d'analyses a été effectuée sur le sol afin de le caractériser.

Le tableau 3.1 montre la caractérisation chimique du sol. L'analyse révèle des concentrations élevées en HAP et en pentachlorophénol (PCP). En effet, on retrouve des concentrations de 3044 mg/kg pour le total des HAP et de 103 mg/kg pour le pentachlorophénol (PCP). Ces valeurs sont bien supérieures à celles du critère indicatif C de la contamination des sols (MENVIQ 1988). Parmi les 16 HAP prioritaires, seules les concentrations en acénaphthylène et en dibenzo(a,h)anthracène sont inférieures à celles de ce critère. Par définition de ce critère C, le sol est donc considéré comme étant contaminé et sujet à une action de restauration.

Tableau 3.1: Caractérisation chimique du sol provenant d'un site industriel de traitement du bois

Contaminants	Concentration (mg/kg)	Critères de la contamination des sols (MENVIQ 1988) (mg/kg)		
		A	B	C
<b>2 anneaux</b>				
naphthalène	114	<0,1	5	50
<b>3 anneaux</b>				
acénaphthylène	17	<0,1	10	100
acénaphthène	247	<0,1	10	100
fluorène	181	<0,1	10	100
phénanthrène	700	<0,1	5	50
anthracène	126	<0,1	10	100
<b>4 anneaux</b>				
fluoranthène	705	<0,1	10	100
pyrène	485	<0,1	10	100
benzo(a)anthracène	128	<0,1	1	10
chrysène	127	<0,1	1	10
<b>5 anneaux</b>				
benzo(b)fluoranthène	80	<0,1	1	10
benzo(k)fluoranthène	48	<0,1	1	10
benzo(a)pyrène	46	<0,1	1	10
dibenzo(a,h)anthracène	3	<0,1	1	10
<b>6 anneaux</b>				
indéno(1,2,3-cd)pyrène	24	<0,1	1	10
benzo(g,h,i)pérylène	13	<0,1	1	10
total des HAP	3 044	1	20	200
pentachlorophénol	103	< 0,1	0,5	5
huiles et graisses minérales	4 843	< 100	1 000	5 000

Une analyse des métaux As, Cr et Cu a montré que le sol n'était pas contaminé par les préservatifs inorganiques utilisés par ce type d'industrie (tableau 3.2). En effet, les concentrations de ces derniers sont toutes inférieures au critère A qui est défini comme étant le bruit de fond des contaminants (tels que les métaux) qui se retrouvent de façon naturelle dans le milieu. Dans un sol contaminé, la présence simultanée de divers types de contaminants peut nuire à l'activité de la microflore. Par exemple, la présence de métaux lourds peut inhiber le métabolisme microbien (Thomas et Lester 1993). Comme les métaux analysés ne se retrouvent pas en grande quantité dans le sol contaminé, ces derniers ne devraient pas interférer dans le processus de biodégradation.

Tableau 3.2: Analyse des métaux du sol provenant d'un site industriel de traitement du bois

Métaux	Concentration (mg/kg)	Critères de la contamination des sols (MENVIQ 1988) (mg/kg)		
		A	B	C
Arsenic (As)	ND	10	30	50
Chrome (Cr)	25	75	250	800
Cuivre (Cu)	51	100	100	500

ND: non détecté

Une analyse granulométrique utilisant la méthode de l'hydromètre (Gee et Bauder 1986) a permis de classifier le sol comme étant un loam sableux. Celui-ci est composé de 13% d'argile, 16% de limon et 71% de sable et possède un pH de 7,5. Le contenu en matières organiques du sol est de 6,35%. La capacité de rétention de l'eau au champ du sol est de 18,5% telle que déterminée avec un extracteur à pression opérant à 30 kPa. Le dénombrement des hétérotrophes totaux indique approximativement  $5,6 \times 10^5$  unités formatrices de colonies (UFC)/g sol sec. Notons que ce nombre n'est pas très élevé considérant qu'un sol typique peut contenir de  $10^6$  à  $10^9$  bactéries/g (Morgan et Watkinson 1989). Enfin, aucune trace des ions solubles  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  n'a été détectée (tableau 3.3) alors qu'un rapport carbone/azote de 90 a été obtenu.

Tableau 3.3: Analyse des ions solubles du sol provenant d'un site industriel de traitement du bois

Concentration (mg/kg)						
Cations			Anions			
Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
40	1540	< 6	2090	< 19	110	< 12

Ceci suggère une déficience du sol pour les nutriments azote et phosphore (N, P) nécessaires au fonctionnement du métabolisme microbien. Tous les protocoles qui ont été utilisés pour la détermination des paramètres présentés dans cette partie sont décrits en annexe. Il est à noter que dans cette étude, tous les résultats sont exprimés sur une base de poids sec.

### 3.2 Agents tensioactifs

Deux surfactants anioniques ont été utilisés pour les expériences de biodégradation et de mobilisation des HAP contenus dans le sol contaminé à la créosote. L'agent tensioactif chimique est le sodium dodécyl sulfate (SDS) fourni par la compagnie Sigma (St. Louis, MO, USA) et les surfactants biologiques sont des rhamnolipides appartenant à la classe des glycolipides, une des classes d'agents tensioactifs biologiques les plus étudiées. Ces derniers ont été produits en laboratoire par la souche bactérienne *P. aeruginosa* UG2 en présence de 2% de glucose et d'un milieu minéral salin (voir section A.12.2). Ce type de rhamnolipides a déjà été caractérisé par d'autres auteurs (Van Dyke et al. 1993b). La figure 3.1 présente la structure des surfactants produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 (Van Dyke et al. 1993b) et du SDS (West et Harwell 1992). Les rhamnolipides de la souche *P. aeruginosa* UG2 se retrouvent sous forme d'anions à des valeurs de pH supérieures à 4 (Rosenberg 1986).

Les études ayant montré que cette souche bactérienne produisait deux types de glycolipides (voir figure 3.1), le pluriel de surfactants sera utilisé dans le présent travail. Notons que plusieurs types de rhamnolipides produits par différentes souches de *P. aeruginosa* ont également été caractérisés par d'autres auteurs (Parra et al. 1989; Syldatk et al. 1985). En fait, il arrive souvent que plusieurs agents tensioactifs soient produits simultanément par une même souche

bactérienne: c'est donc plutôt un mélange de surfactants qui est utilisé dans la plupart des travaux traitant des surfactants biologiques. La souche bactérienne, préalablement isolée d'un sol contaminé par des huiles usées (MacElwee et al. 1990), a été obtenue auprès du Dr. J. T. Trevors de l'Université de Guelph (Guelph, Ontario).

Pour leur utilisation dans les expériences, les rhamnolipides ont été produits en milieu de culture et partiellement purifiés par précipitation acide selon la méthode décrite par Van Dyke et al. (1993b). Après lyophilisation, les surfactants biologiques ont été conservés à la température de la pièce dans un dessiccateur jusqu'au moment de leur utilisation. Les protocoles décrivant les procédures suivies et le matériel utilisé pour la production et la purification des rhamnolipides, pour le suivi du glucose (substrat) et de la densité optique, ainsi que pour la conservation des bactéries sont présentés en annexe.

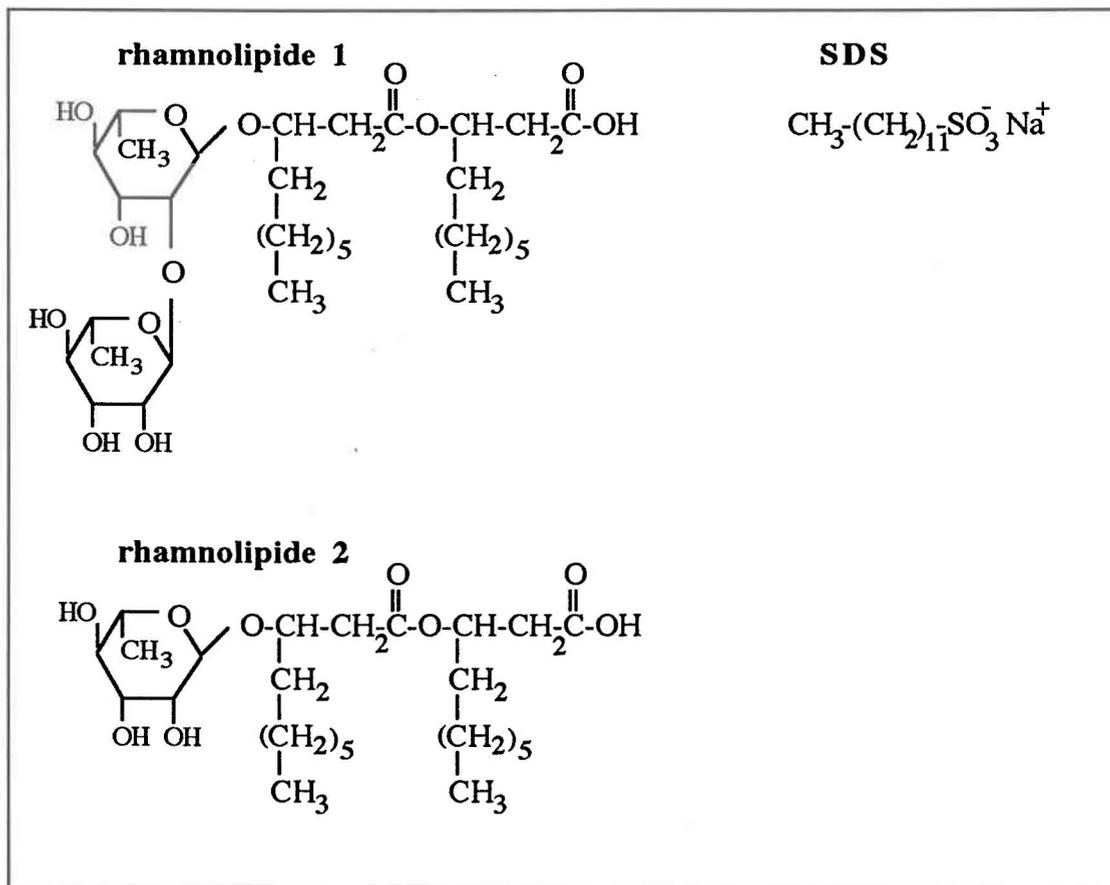


Figure 3.1: Structure des rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* UG2 et du SDS.

### 3.3 Produits chimiques et milieu minéral

Tous les composés suivants marqués au carbone-14 ont été obtenus de la compagnie Sigma (St. Louis, MO, USA): [9-<sup>14</sup>C]fluorène (activité spécifique: 14,2 mCi/mmole), [9-<sup>14</sup>C]phénanthrène (13,1 mCi/mmole), [4,5,9,10-<sup>14</sup>C]pyrène (55 mCi/mmole), [7,10-<sup>14</sup>C]benzo[a]pyrène (16,2 mCi/mmole) et [ $\alpha$ -<sup>14</sup>C]SDS (35,5 mCi/mmole). Ces composés possèdent tous une pureté supérieure à 98%. Le [<sup>14</sup>C]anthracène (11,2 mCi/mmole, pureté de 93%) a été obtenu de la compagnie Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA). Ce composé était uniformément marqué sur l'anneau extérieur. Pour la préparation des solutions de composés radioactifs, un volume connu du composé marqué (100 000 dpm/microcosme) a été déposé dans le fond d'un tube de verre de 16 ml à l'aide d'une seringue de verre. Le solvant a été évaporé sous hotte et les cristaux ont ensuite été dissous dans un volume approprié de milieu minéral salin (MSM, voir ci-après) contenant ou ne contenant pas, selon l'expérience effectuée, l'une des trois concentrations de surfactants étudiés (pour donner finalement 500  $\mu$ g, 100  $\mu$ g et 10  $\mu$ g SDS/g sol sec). Afin d'assurer la dissolution complète des cristaux, les solutions ont été agitées durant 30 minutes avec un agitateur (Wrist Action Shaker modèle 75, Burrell Co., Pittsburg, PA, USA). L'activité exacte de chacune des solutions préparées a été déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard Tri-Card modèle 4530, Packard Instrument Co. Inc., Downersgrove, IL, USA) avant leur addition dans les microcosmes. Le dichlorométhane utilisé pour les expériences était de qualité "pesticide" (pureté > 99,7%, Anachemia Science, Montréal, Qué. Canada). Le méthanol, l'hexane et le CFC-113 (trichloro-1,1,2-trifluoro-1,2,2-éthane), tous de grade pesticide, provenaient de la compagnie Fisher (Fisher Scientific, Montréal, Qué.). La pureté du SDS était supérieure à 99% (Boehringer Mannheim, Allemagne). Les standards 4-fluorobiphényle (Riedel-De-Haën, Allemagne), para-terphényle (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) et 1,2,3-trichlorobenzène (Aldrich) possédaient une pureté > 99%.

Un milieu minéral salin (MSM) a été utilisé pour toutes les expériences de biodégradation des HAP afin d'assurer la présence des nutriments nécessaires au fonctionnement du métabolisme microbien. La composition du milieu MSM est la suivante (mM) (Greer et al. 1990): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 6,4; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 12,99; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 8,33; MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: 0,39; NaNO<sub>3</sub>: 11,79, et: 1 ml/l de milieu de culture d'une solution de métaux traces afin d'obtenir les concentrations finales suivantes ( $\mu$ M): Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 1; AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O: 1; CuSO<sub>4</sub>: 1; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: 1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 10; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: 10, et: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O: 2.

## 3.4 Tensiométrie

La mesure de la tension de surface a été effectuée dans le but de: 1) suivre l'évolution de la tension de surface durant la production de surfactants biologiques par la souche *P. aeruginosa* UG2 et de déterminer de façon indirecte la concentration de ces surfactants produits dans le milieu; 2) déterminer la CMC des deux surfactants étudiés; 3) vérifier l'effet de la présence des microorganismes du sol sur la propriété tensioactive des surfactants étudiés, et: 4) vérifier l'effet du sol sur la quantité d'agents tensioactifs biologiques retrouvée en solution. Les procédures utilisées pour ces quatre expériences (dont les résultats sont présentés au chapitre 4) sont décrites ci-après. Toutes les mesures de la tension de surface ont été effectuées à l'aide d'un tensiomètre (Fisher Surface Tensiomat Model 21 tensiometer) qui emploie un anneau de platine-iridium. Entre chaque mesure, l'anneau a été rincé trois fois avec de l'acétone. Trois lectures ont été effectuées pour chaque échantillon afin de vérifier la reproductibilité des valeurs obtenues.

### 3.4.1 Estimation de la concentration en surfactants biologiques durant leur production par la souche *P. aeruginosa*

Toutes les manipulations effectuées pour la production des surfactants biologiques et la prise d'échantillon pour la tensiométrie sont décrites en annexe (section A.12). Durant la production de surfactants biologiques par la souche *P. aeruginosa* UG2, des échantillons ont été prélevés à intervalle de temps régulier afin de suivre, dans le milieu de culture, l'évolution de la tension de surface. À l'aide de ces échantillons, l'estimation indirecte de la concentration en surfactants biologiques dans le milieu de culture a également été effectuée. Cette estimation indirecte est utilisée dans la littérature (Guerra-Santos et al 1984) et est basée sur le fait que l'activité de surface est dépendante de la concentration dans le milieu des composés actifs. Des mesures de tension de surface ont été effectuées sur l'échantillon de départ et sur des dilutions successives de celui-ci afin de permettre l'élaboration d'un graphique portant en abscisse le logarithme du facteur de dilution, et en ordonné la tension de surface mesurée. À l'aide de ce graphique, le facteur de dilution correspondant à la CMC (voir ci-après, section 3.4.2) est alors déterminé. L'augmentation de ce facteur de dilution (correspondant à la CMC) au cours du temps d'incubation traduit l'augmentation de la concentration des composés actifs dans le milieu de culture. À partir de la valeur connue de la CMC des surfactants biologiques étudiés, la concentration de ceux-ci peut alors être estimée. Pour cette expérience, la production des surfactants biologiques a été effectuée en duplicata.

### **3.4.2 Détermination de la concentration micellaire critique**

Pour la détermination de la CMC, des solutions de chacun des deux surfactants étudiés ont d'abord été préparées dans des fioles volumétriques de 10 ml. La concentration de la solution de surfactants la plus concentrée a été choisie afin d'obtenir environ 10 fois la CMC (obtenue de la littérature) pour chacun des deux surfactants. Le volume final de chacune des solutions d'agents tensioactifs ainsi préparées a été ajusté une fois que les surfactants se soient complètement dissous et que l'effet de moussage soit disparu. À partir de la mesure de la tension de surface effectuée sur la solution de surfactants la plus concentrée et sur les dilutions successives de cette dernière, un graphique a été élaboré en portant en abscisse le logarithme de la concentration en surfactants, et en ordonné la tension de surface mesurée. Pour chacun des agents tensioactifs étudiés, deux courbes ont été obtenues, soit: 1) une courbe de pente nulle correspondant à la tension de surface minimale obtenue de la solution de départ et d'un certain nombre de dilutions de cette solution, et: 2) une courbe correspondant à l'augmentation de la tension de surface à mesure que la concentration en surfactants est diminuée. La CMC a alors été déterminée à partir du point de rencontre des deux courbes obtenues.

### **3.4.3 Effet de la présence des microorganismes du sol sur les propriétés tensioactives des surfactants**

Afin de déterminer de façon qualitative si la propriété tensioactive des surfactants utilisés peut être affectée par la microflore du sol contaminé, une expérience en phase sol/eau a été effectuée. Des microcosmes ont été élaborés de la façon suivante: 6 g de sol ont été ajoutés dans des fioles coniques de 125 ml ainsi que 20 ml d'une solution stérile de MSM contenant des surfactants biologiques (2 g/l) ou du SDS (10 g/l). Ces échantillons ont été préparés en deux répétitions. Un témoin abiotique a aussi été effectué en utilisant du sol stérilisé par irradiation aux rayons gamma (50 kGray à un taux de 28,3 kGray/h par  $^{60}\text{Co}$ ) (Wolf et al. 1989) et un autre microcosme ne contenant pas de surfactants a été préparé pour servir de témoin. Les microcosmes ont été incubés à 20°C sous agitation (200 rpm). À intervalles réguliers, un microcosme de chacun des systèmes étudiés (SDS, surfactants biologiques, sol irradié et, milieu sans surfactants) a été sacrifié afin de déterminer la tension de surface de la phase aqueuse. Pour ce faire, la phase liquide récupérée suite à la décantation de chacun des échantillons a été mise dans un tube de 50 ml pour être ensuite centrifugée à 3000 rpm (Centra 4, International Equipment Co, Needham Heights, MA, USA) durant 15 minutes. Le surnageant a été ensuite

filtré (0,45  $\mu\text{m}$ ) et la mesure de la tension de surface de celui-ci a été effectuée. L'expérience a été répétée trois fois.

#### **3.4.4 Effet de la présence du sol sur la quantité de surfactants biologiques en solution**

Afin de vérifier l'effet de la présence de sol sur la quantité d'agents tensioactifs biologiques retrouvée dans la phase aqueuse, une solution contenant 1g/l de surfactants biologiques a été préparée et filtrée sur 0,45  $\mu\text{m}$ . Vingt millilitres de cette solution ont ensuite été ajoutés à chacun de deux tubes stériles de 50 ml. Dans l'un de ces tubes, 10 g de sol stérilisé aux rayons gamma ont été ajoutés. Les essais ont été préparés en trois répétitions. Les tubes, placés en position horizontale, ont été agités (rotation des tubes sur eux-mêmes) durant une période de 48 heures à la température de la pièce puis les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm durant 5 minutes. Notons que l'agitation a été effectuée durant une période de 48 heures parce qu'à ce temps, la concentration en surfactants biologiques dans la phase liquide ne varie plus avec le temps. Le surnageant a été ensuite filtré sur 0,45  $\mu\text{m}$  et la mesure de tension de surface a alors été effectuée sur le surnageant et sur des dilutions successives de celui-ci afin de déterminer le facteur de dilution correspondant à la CMC (voir section 3.4.1).

### **3.5 Respirométrie**

L'utilisation du respiromètre a été nécessaire à la réalisation de deux expériences, ceci afin de déterminer l'effet d'une part des nutriments et d'autre part des surfactants étudiés sur la respiration globale du sol. En effet et puisque les résultats de la caractérisation du sol contaminé ont montré que ce dernier possédait un faible contenu en azote (rapport C/N élevé) et en ions solubles (formes minérales d'azote et de phosphore), l'effet de l'addition de nutriments sur l'activité microbienne a donc été vérifié. Pour ce faire, la consommation d'oxygène par le sol a été déterminée à l'aide d'un respiromètre électrolytique (Bioscience Management ER-100 Electrolytic Respirometer, Bethlehem, PA, USA). Cet appareil permet de fournir de l'oxygène, par électrolyse de l'eau, au même taux que ce dernier est consommé par le sol. En fait, cette technique permet l'évaluation appropriée de l'activité microbologique globale dans un sol contaminé (Graves et al. 1991). Tel qu'énoncé précédemment, cette technique a aussi été utilisée pour vérifier si la présence des deux agents tensioactifs étudiés avait un effet sur l'activité biologique globale du sol contaminé. Pour cette deuxième expérience, seule la concentration la

plus élevée en surfactants (500  $\mu\text{g/g}$ ) a été étudiée. En plus du nombre restreint de réacteurs disponibles, le choix de cette concentration s'explique par le fait que c'est à cette concentration que l'effet toxique, s'il y en a un, sera le plus marqué. Pour la réalisation de ces deux expériences, une masse de 200 g de sol humide a été déposée dans chacun des réacteurs de un litre. Le contenu en eau du sol a alors été ajusté à 80% de sa capacité au champ avec, selon l'expérience effectuée: 1) eau; 2) MSM (nutriments); 3) MSM + 500  $\mu\text{g/g}$  surfactants biologiques; 4) MSM + 500  $\mu\text{g/g}$  SDS, et: 5) MSM + 0,02% d'azote de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) comme témoin abiotique. Un réacteur contenant 200 ml d'eau acidifiée (0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pH final de 2) a aussi été préparé afin de corriger les données pour les fluctuations de pression atmosphérique. Chacun des réacteurs a été préparé en deux répétitions. L'incubation a eu lieu à une température de 20°C et la consommation d'oxygène dans les réacteurs a été mesurée en continu durant deux semaines.

### 3.6 Minéralisation de composés radioactifs

La minéralisation de composés radioactifs a été effectuée dans le but de déterminer: 1) si le sol contaminé contenait à l'origine la microflore nécessaire à la biodégradation des HAP; 2) la fréquence d'addition des surfactants dans l'expérience de biodégradation des HAP en vérifiant la minéralisation du SDS radiomarqué par la microflore indigène du sol, et: 3) l'effet du SDS sur la minéralisation d'un HAP modèle ( $^{14}\text{C}$ phénanthrène). Lors de ces essais de minéralisation de composés radioactifs fraîchement ajoutés au sol, des bouteilles sérologiques de 125 ml munies d'une trappe à  $\text{CO}_2$  (tube de verre de 5 ml contenant 1 ml de  $\text{KOH}$  1 M) ont été utilisées. La minéralisation est alors mesurée par la production de  $^{14}\text{C}$  $\text{CO}_2$  qui a réagi avec la solution de  $\text{KOH}$ , selon la réaction chimique suivante:



Pour ce faire, une masse de 20 g de sol contaminé a été ajoutée dans chacun des microcosmes. Le contenu en eau du sol a été ajusté à 80% de la capacité au champ avec des solutions de MSM contenant la sonde radioactive voulue ( $^{14}\text{C}$ HAP, ou  $^{14}\text{C}$ SDS, ou  $^{14}\text{C}$ phénanthrène: 100 000 dpm/microcosme). Lorsque nécessaire, des quantités de SDS non marqué ont été dissoutes au préalable dans le MSM afin d'obtenir des concentrations de 10, 100 et 500  $\mu\text{g/g}$  de SDS. Les microcosmes ont alors été fermés hermétiquement à l'aide de valves recouvertes de Téflon (type Mininert, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) et ont été incubés à 20°C à l'obscurité afin

de prévenir la photodégradation des contaminants. Pour chaque série d'expérience, des témoins abiotiques contenant 0,02% d'azoture de sodium ont été préparés afin de suivre les pertes abiotiques des composés radioactifs et d'effectuer une correction sur les résultats obtenus pour les microcosmes contenant les microorganismes actifs. Périodiquement, le KOH contenant le  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$  a été échantillonné pour analyse et remplacé par une solution fraîche d'alcali. Après chaque échantillonnage, de l'air frais a été injecté dans les microcosmes afin de maintenir des conditions aérobies. Les échantillons de KOH (2 ml) ont été ajoutés à 18 ml de liquide à scintillation (ACS scintillation cocktail, Amersham) et comptés pour le  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$  à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard Tri-Card model 4530, Packard Instrument Co. Inc., Downersgrove, IL, USA). Les résultats ont été corrigés en utilisant la courbe de "quench" appropriée. Pour chacune des trois expériences à l'intérieur desquelles des composés radioactifs ont été utilisés, trois répétitions de chaque échantillon ont été effectuées.

## **3.7 Mobilisation des HAP à partir d'un sol contaminé à la créosote**

### **3.7.1 Mobilisation des HAP**

Les HAP étant très hydrophobes, ils sont donc très peu solubles dans l'eau et, pour la plupart de ceux-ci, les concentrations en phase aqueuse sont de l'ordre du  $\mu\text{g/l}$ . Puisque la quantité de HAP retrouvée en phase aqueuse peut être très faible, et puisque toutes traces de contamination extérieure auraient pu interférer avec les résultats, toute la verrerie utilisée lors des expériences de mobilisation a été préalablement lavée à l'acide (acide nitrique 10%, contact d'un minimum de 2 heures et rinçage (6 fois) à l'eau distillée).

La mobilisation des HAP contenus dans le sol contaminé à la créosote a été effectuée en présence de neuf différentes concentrations de chacun des deux surfactants étudiés soit: 0,005; 0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,75; 0,5 et 1% (poids/volume de la phase aqueuse). Les concentrations de surfactants ont été choisies afin d'obtenir des concentrations inférieures et supérieures à la CMC de chacun des deux agents tensioactifs étudiés. Les solutions d'agents tensioactifs ont été préparées en utilisant de l'eau déminéralisée: celles-ci ont été stérilisées par filtration sur 0,45  $\mu\text{m}$ . Cent grammes de sol, préalablement stérilisés aux rayons gamma, ont été ajoutés à 220 ml de la solution de surfactants désirée dans des bouteilles de verre ambré (500 ml) afin de prévenir les pertes abiotiques par photodégradation. Notons que toutes les manipulations ont été

effectuées en conditions aseptiques afin d'éviter la biodégradation des HAP durant la période d'agitation. Pour chacun des essais correspondant à une concentration de surfactant, trois échantillons de sol ont été préparés afin de permettre trois incubations simultanées; sol + surfactants biologiques, sol + SDS et sol + eau seule (absence de surfactants). Les bouteilles ont été agitées à 180 rpm durant 16 heures à la température de la pièce et à l'aide d'un agitateur avec retournement complet ("end over end shaker"). Chaque essai a été réalisé en trois répétitions, ce qui correspond à un total de 27 essais. La mobilisation a été effectuée selon une procédure adaptée de la méthode 1312 de l'USEPA (Chiang et al. 1989) qui est utilisée pour tester le lessivage des contaminants présents dans le sol.

### **3.7.2 Extraction de l'eau du sol**

Après l'agitation de 16 heures, l'eau du sol a été extraite à l'aide d'un appareil de filtration sous pression d'azote (Hazardous Waste Filtration System, Millipore). Pour ce faire, la totalité de chacun des mélanges a été placée sur le filtre de borosilicate de 0,7  $\mu\text{m}$  préalablement placé dans l'appareil. Le système de filtration a ensuite été fermé hermétiquement et une pression d'azote a été appliquée lentement ( $\sim 0,7$  kPa). La pression a ensuite été augmentée par intervalles de 0,7 kPa. Notons qu'à chacune des pressions obtenues (0,7, 1,4, 2,1...kPa), l'écoulement était vérifié et lorsque celui-ci était terminé, la pression était à nouveau augmentée. La pression maximale à atteindre dans le système était de 5 kPa. La phase aqueuse a été récupérée à la sortie de l'appareil dans une fiole conique (afin de mesurer de façon approximative la quantité d'eau extraite) recouverte de papier d'aluminium pour éviter la photodégradation des HAP. Les HAP ont alors été extraits de la phase aqueuse par micro-extraction liquide-liquide.

### **3.7.3 Micro-extraction liquide-liquide**

Dans des bouteilles sérologiques de 60 ml, 9 grammes de NaCl (effet de relargage) ont été ajoutés ainsi que 45 ml de l'échantillon aqueux à analyser. Les standards de récupération (4-fluorobiphényle et paraterphényle) ont ensuite été ajoutés pour obtenir une concentration connue d'environ 100  $\mu\text{g/l}$  de chacun d'eux en phase aqueuse. Les bouteilles, fermées à l'aide de valves (type Mininert) recouvertes de Teflon et placées en position horizontale, ont été agitées (agitateur planaire) à 400 rpm durant 10 minutes afin de permettre la dissolution du sel. À l'aide d'une seringue de verre, 3 ml de chlorure de méthylène ont ensuite été ajoutés et les bouteilles ont été agitées encore une fois, en position horizontale, à 400 rpm, cette fois-ci durant 20

minutes. Les bouteilles, placées en position verticale avec l'ouverture vers le bas (pour faciliter la prise de l'échantillon), ont alors été centrifugées à 2000 rpm à la température de la pièce durant 20 minutes afin d'enlever toute présence d'émulsion. À l'aide d'une seringue, 1 ml de solvant a été retiré et placé dans une fiole ambré pour analyse sur GC/MS.

## 3.8 Biodégradation des HAP dans un sol contaminé à la créosote

### 3.8.1 Conception du dispositif expérimental

Afin d'étudier l'effet des agents tensioactifs sur la biodégradation des HAP dans un sol contaminé à la créosote, des microcosmes en verre de un litre fermés avec un couvert de Teflon ont été utilisés. Une grande quantité de sol (9 kg) a d'abord été mélangée et homogénéisée (à l'aide d'un séparateur de sol) et 350 g de sol ont été ajoutés dans chacun des microcosmes. Le contenu en eau du sol a ensuite été ajusté à 80% de la capacité au champ avec des solutions de MSM dans lesquelles les quantités désirées de l'un ou de l'autre des deux surfactants étudiés avaient été préalablement ajoutées. Les sept différents traitements suivants, chacun effectué en trois répétitions, ont alors été réalisés: 1) absence de surfactant (sol + MSM); 2) sol + 10  $\mu\text{g/g}$  SDS; 3) sol + 100  $\mu\text{g/g}$  SDS; 4) sol + 500  $\mu\text{g/g}$  SDS; 5) sol + 10  $\mu\text{g/g}$  surfactants biologiques de *P. aeruginosa* UG2; 6) sol + 100  $\mu\text{g/g}$  surfactants biologiques de *P. aeruginosa* UG2 et; 7) sol + 500  $\mu\text{g/g}$  surfactants biologiques de *P. aeruginosa* UG2. De plus, des témoins abiotiques ont été effectués en trois répétitions par addition de 0,02% (p/p) d'azoture de sodium au MSM. Le nombre total de microcosmes est donc de 24. À chaque semaine, le sol a été mélangé dans les microcosmes afin de permettre une bonne oxygénation de celui-ci. Comme il avait indépendamment été déterminé par respirométrie (voir section 3.5) que la consommation en oxygène du sol (en présence de MSM) était de 750 mg O<sub>2</sub>/kg durant les sept premiers jours d'incubation, il a été vérifié que l'échange d'air à chaque semaine (75 % v/v) fournissait un apport d'oxygène suffisant pour demeurer en condition aérobie. À un intervalle d'une fois par deux semaines, les quantités d'agents tensioactifs mentionnées ci-haut ont été ajoutées. Dans ce cas, les surfactants ont été dissous au préalable dans une quantité appropriée de MSM afin de permettre le maintien du contenu en eau du sol à 80% de sa capacité au champ; au préalable, une détermination du contenu en eau résiduel était effectuée. L'incubation des microcosmes a été effectuée à 20°C durant 45 semaines à l'obscurité afin de prévenir la photodégradation des HAP. Périodiquement, des échantillons de sol ont été prélevés pour l'analyse des HAP.

### 3.8.2 Extraction en tube des HAP

Les HAP contenus dans le sol (13 grammes de sol humide par analyse) ont été extraits à l'aide de chlorure de méthylène (dichlorométhane). Afin d'obtenir les résultats sur une base de poids sec, une portion de sol (5 g) de chacun des échantillons a été utilisée pour la détermination du contenu en eau. La portion de 8 g de sol restant a été mélangée à 12 g de sulfate de sodium anhydre (Anachemia, Montréal, Qué.) afin d'assécher complètement le sol. Des standards de récupération (4-fluorobiphényle et paraterphényle) ont été ajoutés (200  $\mu$ l d'une solution de dichlorométhane contenant 10 g/l de 4-fluorobiphényle et 10 g/l de paraterphényle) pour donner une concentration finale connue voisine de 250 mg/kg de chacun des deux standards dans le sol. Notons que la présence de ces derniers a permis de corriger les résultats pour le rendement de récupération qui a varié entre 90% et 110%. Le sol a été broyé à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une fine poudre sèche. Le sol a alors été transféré dans des tubes de verre de 50 ml à bouchons (Teflon) vissés. Vingt millilitres de dichlorométhane ont été ajoutés et les tubes ont été agités (Wrist Action Shaker Model 75, Burrell, Co., Pittsburg, PA, USA) à vitesse maximale durant 4 heures. Les tubes ont ensuite été placés sous la hotte durant 20 minutes afin de permettre aux particules de sol de se déposer. Un millilitre de chacun des extraits obtenus a alors été déposé dans un vial à injection pour analyse avec GC/MS.

### 3.8.3 Analyses statistiques

Les différences significatives entre les concentrations résiduelles des HAP (exprimées en pourcentage du témoin abiotique) retrouvées en présence de surfactants et celles obtenues en absence de surfactants ont été identifiées à l'aide d'une analyse de covariance (ANCOVA) en utilisant le programme SAS (Statistical Analysis System Institute 1989). Dans cette analyse, la variable de réponse a été la concentration en HAP et la co-variable a été le temps. L'analyse statistique a été effectuée sur les données individuelles, transformées par le logarithme de ces valeurs, obtenues durant 11 semaines dans le cas des HAP formés de 3 anneaux, et pour toute la période de traitement (45 semaines) dans le cas des HAP formés de 4 anneaux. La comparaison des moyennes estimées par la méthode des moindres carrés ("least square means") et obtenues pour chacun des traitements a alors été effectuée. Ces moyennes ajustées tiennent compte de la relation entre la variable de réponse et la variable indépendante (co-variable). Dans le cas des HAP formés de 5 et 6 anneaux, l'analyse statistique n'a pas été effectuée sur les données obtenues.

Afin de s'assurer que la présence de surfactants biologiques ou de SDS aux trois concentrations étudiées n'affectait pas le rendement d'extraction des HAP, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée sur les concentrations de HAP obtenues dans les différents microcosmes au début du traitement (jour 0). Dans ce cas, la variable de réponse a été la concentration en HAP et la variable indépendante a été le traitement.

### **3.9 Analyse des HAP**

Les extraits de dichlorométhane contenant les HAP ont reçu l'ajout d'un standard d'injection (1,2,3-trichlorobenzène), et la concentration des HAP a été déterminée à l'aide d'un GC/MS (chromatographe en phase gazeuse: Hewlett Packard, Avondale, PA, model 5890, couplé à un spectromètre de masse à détecteur quadrupôle: HP 5970) selon la méthode 8270 (USEPA, 1986) en utilisant le mode SIM (Single Ion Monitoring mode). La séparation a été obtenue par l'injection de 1  $\mu$ l de l'extrait sur une colonne capillaire DB-5 (30 m) de diamètre interne de 0,25 mm avec une phase stationnaire de 0,25  $\mu$ m (J & W Scientific Inc., Folsom, CA, USA). Le gaz porteur était l'hélium. Le programme de température suivant a été effectué: 55°C durant 3 minutes, puis augmentation de la température jusqu'à 280°C à un taux de 4°C/minute. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 275°C et 280°C. Le temps requis pour l'analyse des 16 HAP prioritaires contenus dans un échantillon était de 70 minutes.

# CHAPITRE 4: SURFACTANTS BIOLOGIQUES

---

## 4.1 Introduction

Dans ce chapitre, la production de rhamnolipides par la souche *P. aeruginosa* UG2 ainsi que certaines des propriétés des deux surfactants utilisés dans le présent projet ont été étudiées. L'effet de la présence des microorganismes du sol contaminé sur la propriété tensioactive des surfactants, ainsi que l'effet de la présence du sol sur l'adsorption des agents tensioactifs biologiques, ont également été étudiés. Puisque la présence ou la concentration des surfactants ont été évaluées de façon indirecte par tensiométrie qui nécessite un volume d'eau suffisant pour la mesure, les expériences impliquant la présence du sol contaminé ont été réalisées avec un volume d'eau bien supérieur à celui requis pour la saturation du sol en eau. Même si ces conditions sont différentes de celles employées dans les expériences de mobilisation et de biodégradation des HAP (chapitres 6 et 7), les essais actuels permettent d'obtenir des informations utiles pour l'explication de certains résultats obtenus dans les chapitres suivants.

## 4.2 Résultats

### 4.2.1 Production

La production des surfactants biologiques par la souche *P. aeruginosa* a été effectuée en milieu liquide en présence de 2% (p/v) glucose. Durant l'incubation, le suivi de la concentration du glucose, la tension de surface et la densité optique a été effectué (voir section A.12). La figure 4.1 présente l'évolution temporelle de la tension de surface et de la concentration en surfactants biologiques produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 en présence de 2% (p/v) de glucose. La concentration en surfactants a été évaluée de façon indirecte par la mesure de la tension de surface des échantillons recueillis et par la détermination du facteur de dilution correspondant à l'obtention de la CMC (section 3.4.1). Cette estimation indirecte de la concentration de surfactants dans le milieu liquide, par tensiométrie, est basée sur le fait que l'activité de surface est dépendante de la concentration en composés actifs (Guerra-Santos et al. 1984). Les valeurs de concentrations en surfactants portées en ordonnée à la figure 4.1B ont été estimées avec une valeur de CMC de 0,08 g/l (voir section 4.2.2). Les résultats montrent une augmentation de la

concentration de surfactants biologiques au fur et à mesure que le glucose dans le milieu est dégradé.

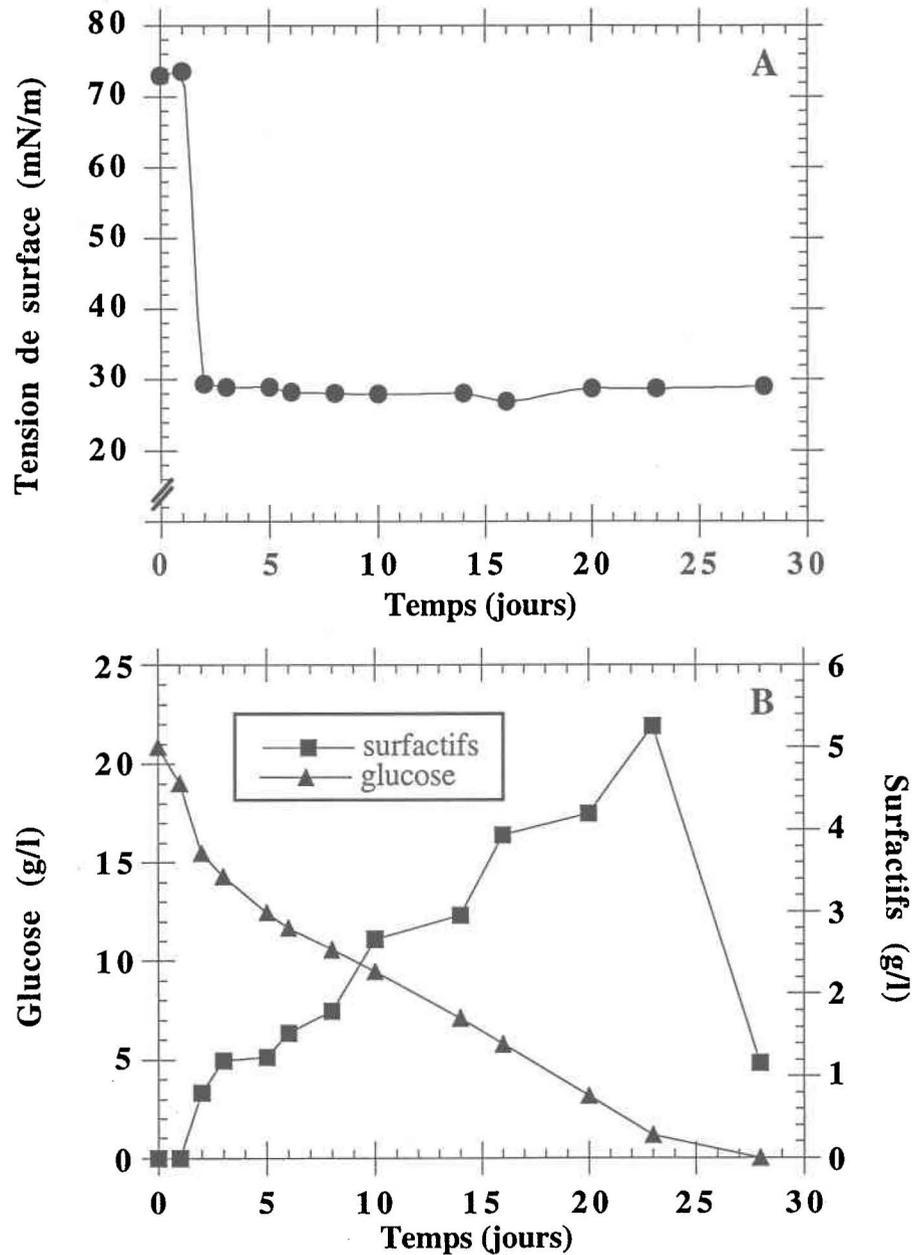


Figure 4.1: Évolution temporelle de: A) la tension de surface et de B) la concentration en glucose et en surfactants durant la production de surfactants biologiques par la souche *P. aeruginosa* UG2.

Puisque la valeur de la tension de surface (73 mN/m) mesurée au jour 1 (figure 4.1A), soit le lendemain du jour de l'inoculation du milieu de culture, était la même que celle mesurée dans le milieu de culture de départ (jour 0), il est présumé que très peu ou pas de surfactants ont été produits durant ce premier jour d'incubation. Notons que cette valeur de tension de surface (73 mN/m) correspond également à celle de l'eau pure à 20-22°C. À partir du deuxième jour, la formation de mousse et une diminution de la tension de surface du milieu de culture ont été observées. En effet, une valeur de tension de surface de 29 mN/m a alors été atteinte et maintenue durant les jours suivants (figure 4.1A). Une quantité plus importante d'agents tensioactifs biologiques a donc été produite à partir du deuxième jour d'incubation. En utilisant une valeur de la CMC de 0,08 g/l (voir section 4.2.2), un rendement maximal d'environ 5 g/l de surfactants biologiques a été estimé au jour 23 (figure 4.1B). Après ce temps d'incubation, une importante diminution de la concentration de surfactants dans le milieu est observée. À ce moment et puisque la concentration en glucose dans le milieu est très faible, les agents tensioactifs biologiques semblent avoir alors été utilisés comme substrat par la souche bactérienne: la source de carbone initiale (glucose) n'étant plus disponible, les surfactants biologiques auraient ainsi été utilisés comme source de carbone. La figure 4.2 présente

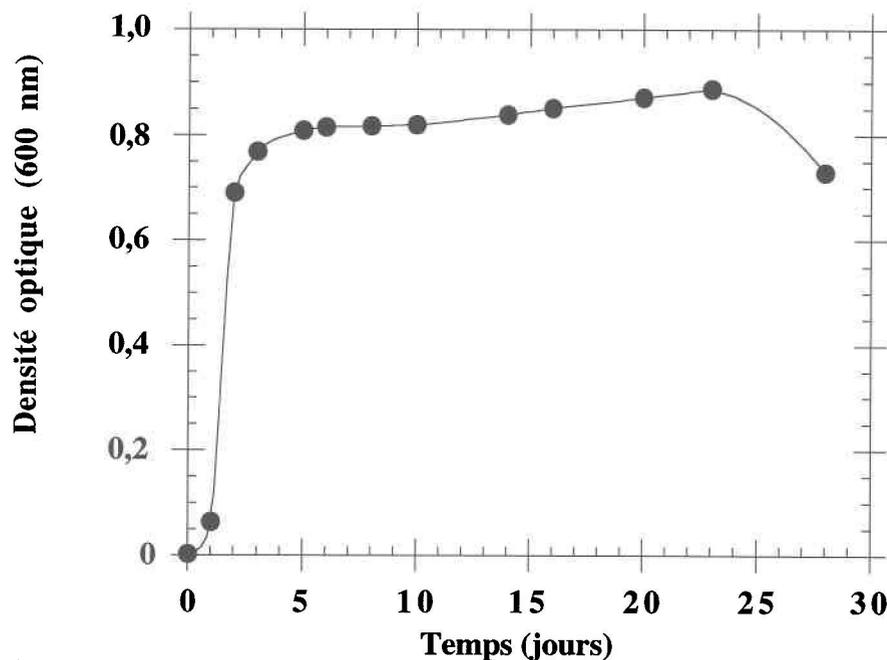


Figure 4.2: Suivi de la densité optique ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) durant la production de surfactants biologiques.

de la densité optique ( $\lambda=600$  nm) du milieu de culture obtenue lors de la production des agents tensioactifs biologiques.

Dans un premier temps, une phase logarithmique de croissance bactérienne est observée durant les trois premiers jours d'incubation. Cette dernière est suivie d'une phase stationnaire pour laquelle, le nombre de bactéries demeure approximativement constant. En comparant les résultats présentés à la figure 4.1 avec ceux de la figure 4.2, on en déduit que la majorité des surfactants a été produite durant cette phase stationnaire de croissance des bactéries. En effet, et en considérant une valeur de la CMC de 0,08 g/l, on estime qu'une production de 4 g/l d'agents tensioactifs a été obtenue durant cette période (jours 5 à 23). Finalement, au jour 28, une diminution de la densité optique est observée, suggérant que le nombre de bactéries aurait diminué suite à la perte dans le milieu du substrat disponible.

#### 4.2.2 Propriétés

Puisque l'efficacité des agents tensioactifs peut être évaluée par la mesure de la tension de surface et par la détermination de la CMC (Parkinson 1985), ces deux propriétés ont été estimées pour les deux agents tensioactifs étudiés. Des solutions contenant différentes quantités des deux surfactants étudiés ont donc été effectuées et la tension de surface de ces dernières a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre (voir section 3.4). Les résultats ont montré que les surfactants produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 abaissaient la tension de surface de l'eau à une valeur inférieure à celle obtenue avec le SDS. En effet, et en présence de surfactants biologiques, la tension de surface de l'eau a été abaissée de 72 à 28-29 mN/m, comparativement à 38-39 mN/m en présence de SDS (figures 4.3 et 4.4). Pour la mesure de la CMC, une valeur de 0,08 g/l a été obtenue pour les surfactants biologiques. En effet, une valeur de -1,097 a été obtenue (figure 4.3) pour le logarithme de la concentration en surfactants biologiques au point de rencontre des deux courbes (ce qui correspond à une concentration de 0,08 g/l). Comparativement à cette dernière, la valeur de la CMC obtenue pour le SDS est presque 20 fois supérieure: en effet, une valeur de 1,5 g/l a été déterminée (la valeur  $\log(\text{concentration en SDS})$  au point de rencontre des deux courbes étant égale à 0,1818; figure 4.4). Ces résultats indiquent que pour réaliser la formation de micelles, et comparativement aux surfactants biologiques, une plus grande concentration de SDS dans le milieu est nécessaire.

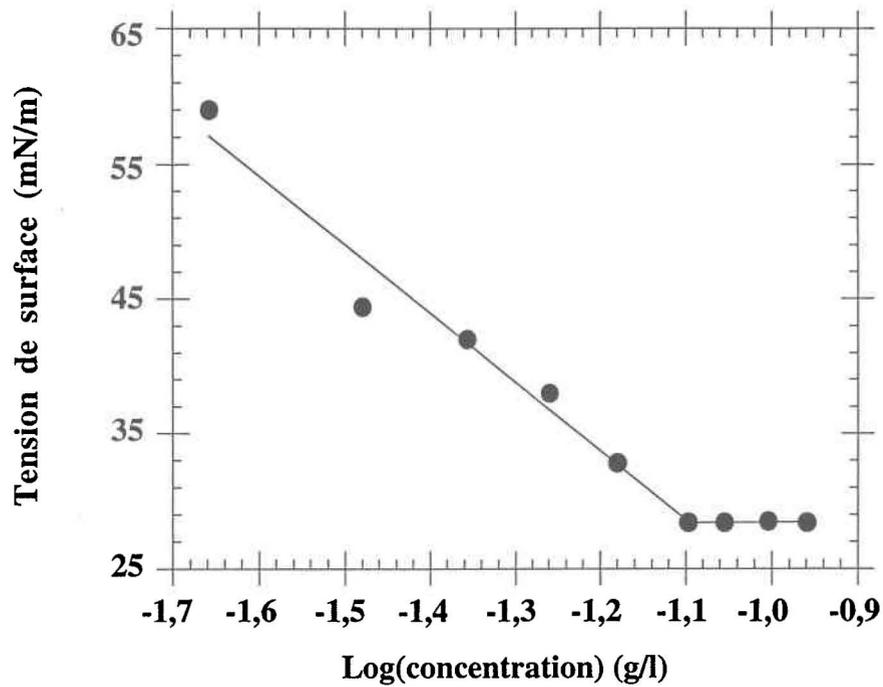


Figure 4.3: Détermination de la CMC des surfactants biologiques produits par la souche *P. aeruginosa* UG2.

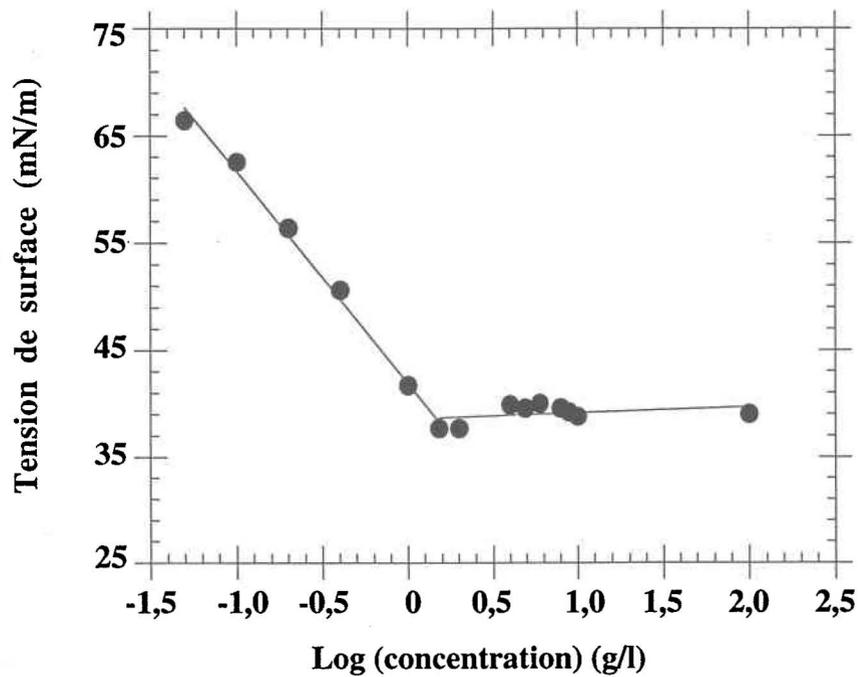


Figure 4.4: Détermination de la CMC du SDS.

### 4.2.3 Effet des microorganismes du sol contaminé sur la propriété tensioactive des surfactants

L'effet de la présence des microorganismes du sol contaminé sur la propriété tensioactive des deux surfactants étudiés a été vérifié dans un système sol/eau. Brièvement, des solutions des deux agents tensioactifs ont été mises en contact avec le sol contaminé et, à intervalles de temps réguliers, les échantillons ont été centrifugés, puis la phase aqueuse a été filtrée pour enlever toutes particules solides et des mesures de tension de surface ont alors été effectuées sur cette dernière (voir section 3.4.3). Le tableau 4.1 présente les résultats obtenus de l'expérience effectuée pour les agents tensioactifs biologiques en présence de sol non stérilisé et de sol stérilisé.

Tableau 4.1: Effet des microorganismes du sol sur la propriété tensioactive des surfactants biologiques

Temps (heures)	Tension de surface (mN/m)		
	sol non stérilisé # 1 (2 g/l surfactants)	sol stérilisé #2 (2 g/l surfactants)	sol non stérilisé #3 (sans surfactants)
0	30,0	30,0	60,0
24	31,1	30,7	59,0
48	31,0	31,2	59,1
72	32,0	31,3	59,1
96	39,0	31,3	59,0
120	64,0	31,8	59,1

Dans un premier temps, les résultats montrent une augmentation, avec le temps, de la tension de surface de la phase aqueuse extraite du sol non stérilisé contenant les agents tensioactifs biologiques (échantillon #1). En effet, la tension de surface initiale de 30 mN/m est augmentée à 64 mN/m après 5 jours (120 heures) d'incubation. Puisque cette dernière valeur est comparable à celle obtenue avec le sol non stérilisé ne contenant pas de surfactants (échantillon #3), soit 59-60 mN/m, les résultats suggèrent qu'après 5 jours, les surfactants biologiques ajoutés au sol non stérilisé n'exercent plus d'effet sur la tension de surface de la phase aqueuse. À l'opposé et dans le témoin abiotique ou sol stérilisé (échantillon #2), les surfactants

biologiques ont toujours conservé leur propriété tensioactive: la tension de surface a été maintenue durant toute la période d'incubation entre 30 et 32 mN/m. La perte de la propriété d'action sur la tension de surface dans le sol non stérilisé (échantillon #1) contenant des microorganismes actifs, est donc attribuée à la présence de ces derniers, et non à la perte en phase aqueuse de molécules de surfactants par adsorption sur le sol.

Des observations qualitatives intéressantes ont également été réalisées durant les manipulations en laboratoire. Au tout début de l'expérience, les phases aqueuses des échantillons de sol contenant des agents tensioactifs biologiques (sol non stérilisé et témoin abiotique) étaient de couleur brun foncé et présentaient un moussage tandis que celle de l'échantillon ne contenant pas de surfactants biologiques était de couleur jaune clair, sans moussage. Cette couleur brun foncé était probablement due à une plus grande solubilisation de matières organiques du sol en présence des surfactants. Au cours de l'expérimentation, la phase aqueuse de l'échantillon de sol non stérilisé contenant les surfactants biologiques devenait de plus en plus claire pour finalement atteindre la même couleur jaune clair que celle de l'échantillon de sol non stérilisé sans surfactants, suggérant ainsi une perte des propriétés (ou de concentration) des surfactants biologiques ajoutés. À l'opposé, la phase aqueuse du témoin abiotique est demeurée de couleur brun foncé et a conservé sa faculté de moussage durant toute la durée de l'expérience. Ces observations suggèrent donc, une fois de plus, la perte de la propriété tensioactive (et probablement de la concentration) des agents tensioactifs biologiques en présence des microorganismes du sol contaminé.

Des résultats similaires ont été obtenus en présence de SDS (tableau 4.2). En effet, la propriété tensioactive du SDS a également été perdue au cours de l'expérimentation dans le cas du sol non stérilisé (échantillon #1). Cependant, malgré une concentration de SDS plus élevée en phase aqueuse (10 g/l au lieu de 2 g/l pour les surfactants biologiques), seulement 3 jours (72 heures) ont suffi pour que la tension de surface initiale de 29 mN/m atteigne une valeur (57 mN/m) équivalente à celle retrouvée dans l'échantillon ne contenant pas de SDS (59 mN/m). La perte de la propriété tensioactive obtenue en présence de microorganismes est donc plus rapide avec le SDS que celle observée avec les agents tensioactifs biologiques. Au contraire du sol non stérilisé, la tension de surface de 29 mN/m retrouvée dans le témoin abiotique (échantillon #2) est demeurée constante pour toute la durée de l'expérience. Des observations qualitatives semblables à celles décrites dans le cas des surfactants biologiques ont également été réalisées. De plus, et à partir de 66 heures, un culot de bactéries a été observé à la surface du sol après

centrifugation dans le cas du sol non stérilisé (échantillon #1) contenant le SDS. Cette dernière observation suggère un développement important des microorganismes dans le sol non stérilisé en contact avec le SDS.

Tableau 4.2: Effet des microorganismes du sol sur la propriété tensioactive du SDS

Temps (heures)	Tension de surface (mN/m)		
	sol non stérilisé #1 (10 g/l SDS)	sol stérilisé #2 (10 g/l SDS)	sol non stérilisé #3 (sans SDS)
0	29,0	28,9	60,0
16	29,0	28,9	
23	29,0	28,8	59,0
41	29,0	28,7	
47	33,0	29,4	59,1
66	42,0	29,4	
72	57,0	29,1	59,1

Finally, in the system not containing surfactants (sample #3), the surface tension remained constant with a value close to 60 mN/m. The presence of non-sterilized soil exerts a certain influence on the surface tension of the water, which is normally close to 72 mN/m. In fact, several natural compounds present in the soil can possess surfactant properties, such as humic and fulvic substances (West and Harwell 1992). This influence is however negligible when compared to that exerted by one or the other of the two surfactants studied.

#### 4.2.4 Effet du sol stérilisé sur la quantité de surfactants biologiques en solution

Figure 4.5 illustrates the effect of the addition of sterilized soil on the quantity of biological surfactants recovered in the aqueous phase. For this purpose, a solution of biological surfactants was incubated alone or in the presence of sterilized soil during a certain period of time (see section 3.4.4). The curves correspond to the measurement of the surface tension as a function of the dilution factor of the aqueous phase. Note that similar curves are used in the literature concerning the adsorption of surfactants in soil/water systems (Edwards et al. 1994b). The point

d'inflexion, à partir duquel une dilution supplémentaire de la phase aqueuse a pour effet d'augmenter la tension de surface, correspond à la dilution à laquelle est retrouvée la CMC du surfactant (facteur de dilution correspondant à la CMC).

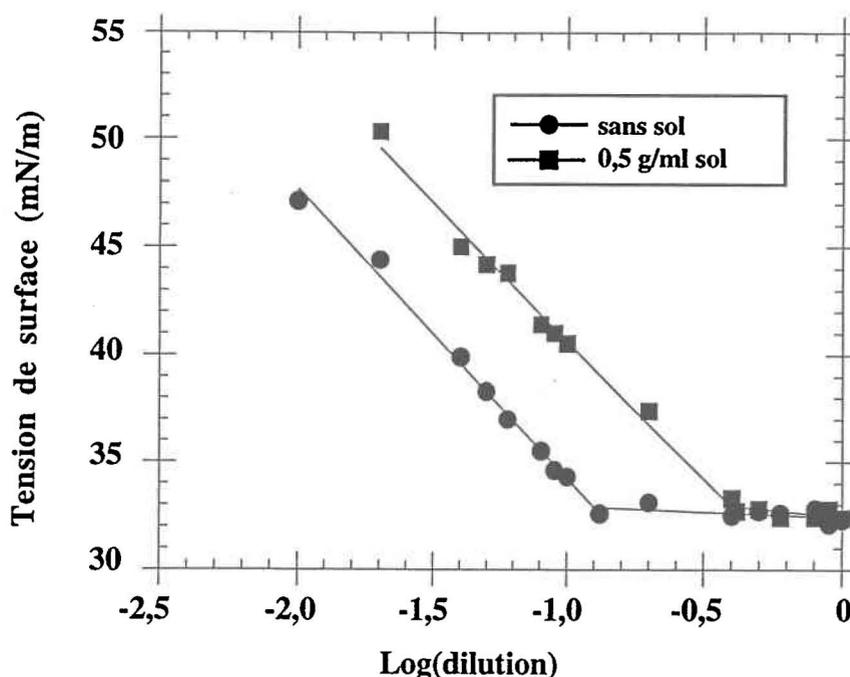


Figure 4.5: Courbe de tension de surface d'une solution de surfactants biologiques (1 g/l) seule ou en présence de sol stérilisé (rapport sol/eau 0,5).

Les résultats montrent que la présence de sol a pour effet de déplacer ce point d'inflexion vers la droite. En effet et en présence de sol stérilisé, un facteur de dilution de la phase aqueuse plus petit a été requis pour obtenir une concentration correspondant à la CMC: ceci s'explique par une concentration de surfactants biologiques plus faible dans la phase aqueuse de l'échantillon contenant le sol. La présence de sol stérilisé a donc pour effet de diminuer la concentration de surfactants biologiques en phase aqueuse. Une certaine quantité de surfactants biologiques se retrouve donc adsorbée au sol contaminé à la créosote.

En effet et en considérant une CMC de 0,08 g/l, la concentration des agents tensioactifs biologiques en phase aqueuse et en absence de sol serait d'environ 0,7 g/l, tandis qu'elle serait d'environ 0,2 g/l en présence de sol (temps de contact avec le sol de 48 heures) ceci pour un rapport sol/eau de 0,5 (p/v).

Ces résultats indiquent qu'environ 70% de la quantité de surfactants en solution se retrouverait adsorbée sur le sol stérilisé dans ces conditions. Le sol contaminé aurait donc une capacité d'adsorption non négligeable pour les agents tensioactifs biologiques étudiés.

### 4.3 Discussion

Les résultats ont montré qu'une grande quantité de surfactants biologiques a été produite durant la phase stationnaire de croissance des bactéries de la souche *P. aeruginosa* UG2. Cependant, une certaine production a également été observée durant la phase exponentielle de croissance des bactéries. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Jain et al. (1992) dans lesquels les surfactants de la même souche de bactéries ont été principalement produits durant la phase stationnaire de croissance. La production de rhamnolipides par différentes souches de *P. aeruginosa* a également été rapportée dans la littérature et des résultats semblables ont été obtenus (Kosch et al. 1991). Notons que la production de surfactants par certaines souches de *P. aeruginosa* est souvent associée à la phase stationnaire de croissance des bactéries, car ces surfactants biologiques sont produits principalement en condition limitante pour l'azote (Guerra-Santos et al. 1984; Parkinson 1985).

Les surfactants produits par la souche de *P. aeruginosa* UG2 ont montré des propriétés tensioactives importantes donc intéressantes pour l'étude de la biodégradation et la mobilisation des HAP contenus dans un sol contaminé. En effet, la présence de ces agents tensioactifs biologiques a diminué la tension de surface de l'eau à une valeur de 28-29 mN/m. Une valeur minimale de 31,4 mN/m a été obtenue avec la même souche bactérienne par d'autres auteurs (Van Dyke et al. 1993b). En général pour les rhamnolipides produits par d'autres espèces de *Pseudomonas*, des valeurs de tension de surface se situant entre 25 et 30 mN/m ont été observées (Gutnick et Minas 1987). Dans le cas de la CMC, une valeur de 0,08 g/l a été déterminée pour les surfactants biologiques produits dans le présent travail. Cette dernière se compare à la valeur de 0,03 g/l retrouvée suite aux travaux de Van Dyke et al. (1993b), ceci avec des surfactants partiellement purifiés et produits par la même souche bactérienne. La différence retrouvée entre les deux CMC peut s'expliquer par le degré de purification des surfactants. En effet, plus les surfactants seront purs, plus ces derniers posséderont une faible CMC. La valeur obtenue se retrouve également comprise entre les valeurs de CMC retrouvées en général pour les rhamnolipides produits par d'autres espèces de *Pseudomonas* qui varient de 0,01 à 0,1 g/l (Gutnick et Minas 1987). Comparativement aux agents tensioactifs biologiques étudiés, le SDS

a provoqué une moins grande diminution de la tension de surface et a présenté une plus grande valeur de CMC. Quoique différente, la valeur de la CMC obtenue pour le SDS (1,5 g/l) est cependant comparable à celle retrouvée dans la littérature qui est de 2,31 g/l (Clarke et al. 1992). La différence entre les deux valeurs obtenues pourrait s'expliquer, s'il y a lieu, par des températures ambiantes différentes lors de la détermination de la CMC. Ceci ne peut cependant pas être vérifié. En général, plus la CMC est faible, plus l'agent tensioactif est efficace pour la formation de micelles (Kosaric et al. 1983; Parkinson 1985).

La présence des microorganismes viables du sol contaminé a eu un effet sur les propriétés tensioactives des deux surfactants étudiés. En effet, après un certain temps d'agitation en présence du sol non stérilisé, la tension de surface dans le milieu contenant les surfactants est devenue semblable à celle obtenue en absence des agents tensioactifs. Cette perte de la propriété tensioactive a été observée après 5 et 3 jours d'incubation, respectivement pour les surfactants biologiques et pour le SDS. À l'opposé, dans les témoins abiotiques, la tension de surface du milieu est demeurée constante durant toute la durée de l'essai. Ces résultats, ajoutés aux observations qualitatives décrites à la section 4.2.3, suggèrent que les bactéries du sol ont dégradé les surfactants ajoutés dans le milieu. Ces résultats sont conformes aux informations recueillies dans les études portant sur la biodégradabilité des agents tensioactifs étudiés, tel que le SDS. Par exemple, les voies métaboliques de dégradation du SDS par les bactéries ont déjà été décrites dans la littérature (White et Russel 1992). Dans une autre étude, la biodégradabilité élevée du SDS présent dans les eaux usées a été mise en évidence par trois différentes méthodes expérimentales (Struijs et Stoltenkamp 1994). Par ailleurs, la biodégradation en phase liquide des rhamnolipides produits par la souche étudiée, par des microorganismes isolés d'un sol contaminé à la créosote, a également été démontrée (Providenti 1994). Ce dernier auteur a déterminé, par le suivi de la concentration en rhamnolipides, que 99% des surfactants ajoutés dans la phase liquide ont été biodégradés en 9 jours. Dans le présent travail, la perte de la propriété tensioactive des agents tensioactifs étudiés s'explique par la perte du caractère amphiphile des molécules de surfactants c'est-à-dire par la perte (ou l'atténuation) de la partie hydrophile et/ou hydrophobe des surfactants. En conclusion, les résultats obtenus ont montré la perte de la propriété tensioactive des surfactants attribuable aux microorganismes du sol. Cependant, même si le but de la manipulation à savoir si les microorganismes du sol pouvaient affecter les propriétés tensioactives des surfactants a été atteint, la biodégradation complète des deux surfactants ne peut être vérifiée par la méthode expérimentale employée dans le présent chapitre.

Dans la dernière expérience, les résultats ont montré que la présence du sol contaminé stérilisé a eu pour effet de diminuer la quantité de surfactants biologiques dans la phase aqueuse. Ceci suggère donc qu'une partie de ces derniers (approximativement 70%) est adsorbée sur le sol dans les conditions expérimentales appliquées. Des résultats indiquant une adsorption importante des agents tensioactifs partiellement purifiés et produits par la même souche bactérienne ont également été obtenus par d'autres auteurs (Van Dyke et al. 1993b). Par exemple et dans un système sol/eau, 74%, 49%, 38% et 20% des rhamnolipides respectivement présents dans des solutions de 0,5, 1, 2 et 5 g/l ont été adsorbés sur un loam limoneux. Dans l'étude en question, ces résultats ont permis d'expliquer qu'une concentration élevée de surfactants biologiques avait été nécessaire pour solubiliser les hydrocarbures étudiés. En fait, et si d'une part l'augmentation de la solubilisation des contaminants hydrophobes dépend de la présence de micelles de surfactants (donc de l'atteinte de la CMC), et si d'autre part le surfactant utilisé se retrouve en partie adsorbé sur la phase solide, alors la solubilisation des contaminants n'aura lieu que pour une concentration en surfactant plus élevée que la CMC. En effet, l'adsorption de surfactant sur le sol s'accompagne d'une diminution de sa concentration en phase aqueuse: l'augmentation de la solubilisation du contaminant sera observée à une concentration de surfactant appelée CMC effective, avec  $CMC \text{ effective} \gg CMC$  (Liu et al. 1991).

L'adsorbabilité des surfactants peut devenir un critère non négligeable lors du choix d'un agent tensioactif pour son utilisation à l'intérieur des technologies de lavage de sol contaminé par des composés hydrophobes. À cet égard, plusieurs études ont porté sur l'adsorption dans le sol de certains surfactants chimiques anioniques (DiToro et al. 1990; Hand et Williams 1987) et non-ioniques (Liu et al. 1992a; 1992b). Évidemment et en plus de l'agent tensioactif et des conditions utilisées, les résultats obtenus dépendent grandement du type de sol employé. En général, en comparaison avec les surfactants non-ioniques, les surfactants anioniques apparaissent moins sujets à l'adsorption sur la plupart des surfaces minérales à cause de leur charge négative (West et Harwell 1992). Par ailleurs, la matière organique du sol constitue également une fraction importante des sites d'adsorption pour la rétention de la partie hydrophobe des surfactants. L'adsorption des agents tensioactifs n'a pas été étudiée par voie directe dans le présent travail: cependant, il peut être conclu que la présence du sol contaminé et stérilisé a affecté la concentration des surfactants biologiques en solution. Finalement, l'adsorption des surfactants sur les sols demeure un sujet de recherche pertinent dans le domaine de la restauration des sites contaminés. En plus de modifier éventuellement la concentration des

surfactants requise pour obtenir la formation de micelles, l'adsorption des surfactants peut aussi contribuer à augmenter le contenu organique du sol, et ainsi modifier les propriétés adsorbantes de ce dernier pour les composés hydrophobes. En effet, des résultats ont montré que des molécules de surfactants adsorbées au sol (surfactants non ioniques de deux classes connues: alkyl éthoxylates et alkylphénol éthoxylates) tendaient à augmenter l'adsorption de contaminants hydrophobes tels que les HAP (Edwards et al. 1994a). De plus, des résultats ont même indiqués que des agents tensioactifs adsorbés (sulfonates) pouvaient constituer une phase adsorbante plus efficace pour des contaminants hydrophobes que ne le serait la matière organique naturelle du sol (Sun et Boyd 1993). La formation d'hémimicelles peut également causer une diminution de la concentration des composés hydrophobes en solution (Brickell et Keinath 1991). En effet, si la partie hydrophile des agents tensioactifs se trouve adsorbée sur la surface du sol et que cette dernière devient saturée en surfactants, les parties hydrophobes des molécules supplémentaires de surfactants vont former une double couche avec les surfactants adsorbés. Il y aura donc formation d'hémimicelles à la surface du sol à l'intérieur desquelles les contaminants hydrophobes pourront se retrouver. Finalement, la biodisponibilité des surfactants peut être affectée par ce phénomène (Liu et al. 1992b) et ainsi modifier leur biodégradabilité.

D'un point de vue applicabilité sur le terrain, la perte des propriétés tensioactives des surfactants étudiés en présence des microorganismes viables du sol implique que les surfactants doivent être ajoutés selon une certaine fréquence d'addition si l'on veut assurer une action de ceux-ci durant toute la durée d'un traitement de restauration. D'un autre côté, si les surfactants sont biodégradés dans le milieu, ceci implique qu'il n'y aura pas de contamination ultérieure par ces agents tensioactifs une fois le traitement terminé. La perte de surfactants par adsorption sur le sol est également importante à considérer lors du choix d'un surfactant pour un procédé de remédiation. En effet, une plus grande quantité de surfactants peut alors être nécessaire pour la formation de micelles ce qui peut impliquer des coûts de traitement plus élevés. Comme une efficacité maximale est le critère de sélection d'un surfactant, la durée d'action d'un surfactant et la perte de surfactant par adsorption sont donc des facteurs importants à considérer lors du choix d'un surfactant pour son utilisation dans les techniques de restauration des sites contaminés.

## 4.4 Conclusions

En résumé, les principales conclusions qui peuvent être tirées des résultats obtenus dans le présent chapitre sont:

- La production d'agents tensioactifs par la souche *P. aeruginosa* UG2 en présence de glucose s'effectue principalement durant la phase stationnaire de croissance des bactéries.
- Une fois partiellement purifiés, les surfactants biologiques présentent des propriétés tensioactives (diminution de la tension de surface, valeur de la CMC) plus importantes que celles retrouvées pour le SDS.
- Dans les conditions étudiées, la présence des microorganismes viables dans le sol contaminé a eu un impact sur l'action des surfactants utilisés laissant croire que les surfactants biologiques et le SDS seraient biodégradés par cette microflore indigène du sol.
- Enfin, la quantité de surfactants biologiques retrouvée dans la phase aqueuse a été affectée par la présence de sol stérilisé. Ce dernier joue donc un rôle dans l'adsorption des agents tensioactifs biologiques produits par la souche *P. aeruginosa* UG2.

# CHAPITRE 5: DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION DES HAP

---

## 5.1 Introduction

Afin de vérifier l'effet des agents tensioactifs étudiés sur la biodégradation des HAP dans un sol contaminé à la créosote (chapitre 7), une méthode appropriée d'extraction des contaminants dans le sol doit d'abord être choisie. L'extraction des HAP par le Soxhlet constitue une méthode standard bien documentée (méthode 3540, USEPA 1986). Cependant, cette dernière est très laborieuse et requiert de longues manipulations. Puisqu'il est impossible de réaliser par cette méthode les 24 extractions requises pour chaque prélèvement de sol (chapitre 7) dans un temps acceptable, une autre méthode d'extraction a dû être développée. Dans le présent chapitre, deux autres méthodes d'extraction des HAP ont donc été étudiées, soit la méthode utilisant les fluides supercritiques (SFE) et la méthode en tubes. À cet égard, la méthode du Soxhlet utilisée dans ce travail constitue donc une méthode de référence pour le développement et l'évaluation des deux autres méthodes d'extraction. En résumé, l'extraction aux fluides supercritiques est une nouvelle technique d'extraction qui utilise comme solvant un gaz soumis à une température et une pression comprises dans une région nommée supercritique (Hawthorne 1990; Majors 1990). Dans ces conditions de pression et de température supercritiques, un fluide n'est ni un gaz, ni un liquide. Cependant et comme un liquide, le fluide a la propriété chimique de solubilisation et, comme un gaz, il possède la propriété physique de diffusion. Ces propriétés rendent l'utilisation de fluides supercritiques très intéressante pour l'extraction de polluants contenus dans un sol. De plus, cette méthode comporte plusieurs avantages tels que la rapidité, l'utilisation de peu ou pas de solvant organique, le pouvoir variable du solvant (dépendamment de la pression et de la température d'extraction employées) et un bas niveau de toxicité (peu ou pas de rejet de solvant) (Hawthorne 1990). Cette méthode nécessite néanmoins un développement afin de connaître et d'améliorer son rendement et sa reproductibilité d'extraction. Par suite de la nécessité d'appliquer une méthode à la fois rapide et reproductible, une deuxième méthode qui ne requiert pas beaucoup de manipulations, soit la méthode en tubes, a également été mise au point. En regard de la très grande importance de disposer d'une méthode adéquate d'extraction des HAP du sol, et devant l'intérêt présenté par les résultats obtenus à partir des trois méthodes d'extraction des HAP, ce chapitre est entièrement consacré au développement d'une méthode d'extraction appropriée.

## 5.2 Résultats

### 5.2.1 Rendement d'extraction

#### 5.2.1.1 Extraction au fluide supercritique

Dans cette section, différentes conditions d'extraction des HAP par un fluide supercritique (CO<sub>2</sub>) ont été étudiées soit la température, la pression et l'ajout de co-solvant (méthanol ou dichlorométhane; pour protocole voir section A.2). Dans la plupart des figures, le rendement de récupération (relatif) exprimé en pourcentage correspond aux résultats obtenus par la méthode SFE comparés à ceux obtenus par la méthode standard du Soxhlet (récupération = [quantité extraite par SFE/quantité extraite par Soxhlet] x 100). Des rendements d'extraction supérieurs à 100% indiquent donc qu'une plus grande quantité de HAP a été extraite par la méthode SFE comparativement à la méthode du Soxhlet. Chacune des figures présente le résultat obtenu pour un seul échantillon. Les figures 5.1 et 5.2 présentent les résultats obtenus pour les différentes conditions de température et de pression pour le sol contaminé à la créosote.

Pour les HAP formés de 2, 3 et 4 anneaux (figure 5.1), les résultats montrent qu'à des valeurs de pressions de 400 et de 500 kPa, une augmentation de la température a eu pour effet d'augmenter le pourcentage de récupération. Par exemple et à une pression de 400 kPa, des pourcentages relatifs de récupération de 34%, 47% et 85% ont été obtenus pour des températures respectives de 60°C, 100°C et 150°C. À l'opposé et à une pression de 600 kPa, une baisse de la récupération des HAP est observée à une température de 150°C. En effet, un pourcentage de récupération de seulement 61% a été obtenu à 150°C, comparativement à 110% obtenu pour une température inférieure (100°C). À l'exception de ce même cas (150°C, 600kPa) et pour une même température, une augmentation de la pression se traduit par un pourcentage de récupération plus élevé. Pour les HAP formés de 5 et 6 anneaux (figure 5.2), les résultats montrent que pour une pression donnée, une augmentation de la température s'accompagne dans tous les cas d'une augmentation du pourcentage de récupération. Par exemple, à une pression de 600 kPa, des pourcentages de récupération de 39%, 77% et 113% ont été obtenus pour des températures respectives de 60°C, 100°C et 150°C. Pour les HAP formés de 5 et 6 anneaux, un bon pourcentage de récupération est observé (autour de 100%) à une température de 150°C, et ceci pour les trois pressions étudiées.

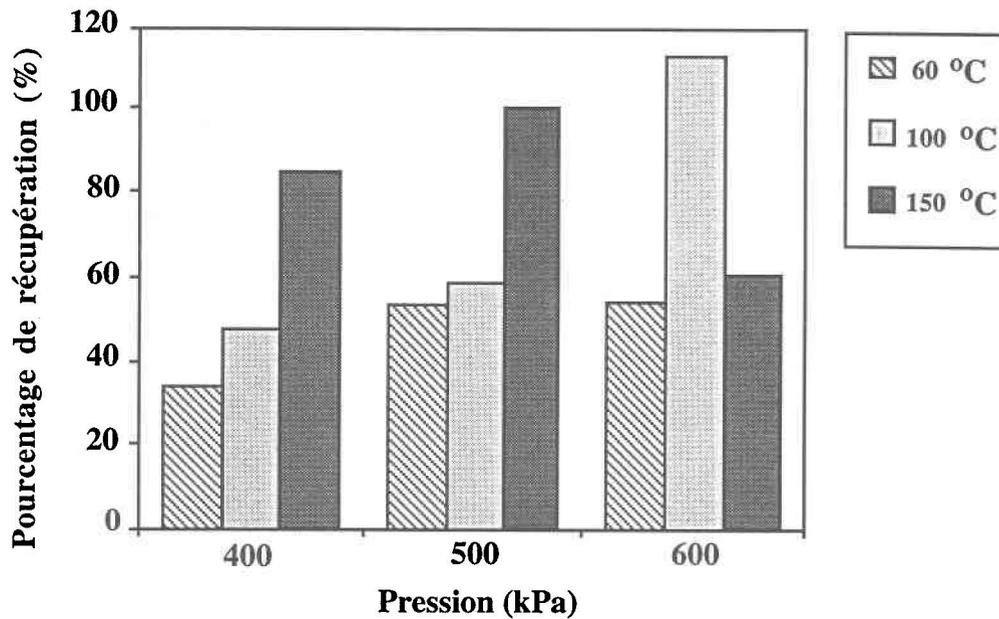


Figure 5.1: Pourcentage de récupération des HAP de 2, 3 et 4 anneaux contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE pour différentes conditions de température et de pression.

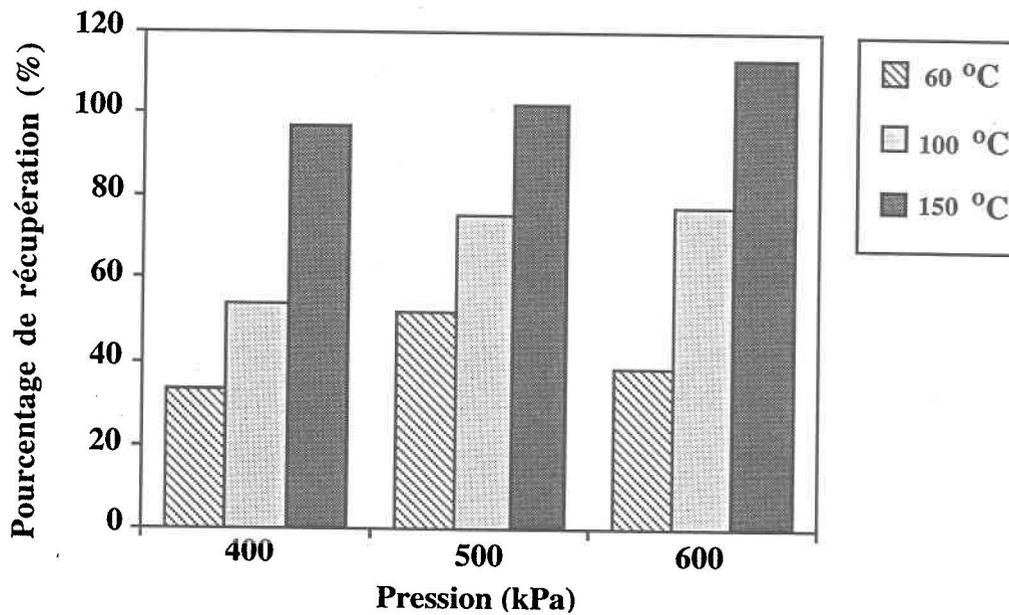


Figure 5.2: Pourcentage de récupération des HAP de 5 et 6 anneaux contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE pour différentes conditions de température et de pression.

Pour l'ensemble des 16 HAP étudiés, un pourcentage de récupération autour de 100% a été observé à une température de 150°C et à une pression de 500 kPa. En effet et dans ce cas, des pourcentages de récupération de 100% ont été obtenus pour les HAP formés de 2, 3 et 4 anneaux, et de 102% pour les HAP formés de 5 et 6 anneaux. Notons enfin que pour les 16 HAP prioritaires (figures 5.1 et 5.2), c'est à une température de 60°C que les pourcentages de récupération les plus faibles ont été observés (entre 35% et 50%) et ceci quelle que soit la pression utilisée.

Avec l'utilisation de co-solvants (figure 5.3), les résultats montrent que le meilleur pourcentage de récupération a été obtenu en absence de co-solvant et à une pression de 600 kPa.

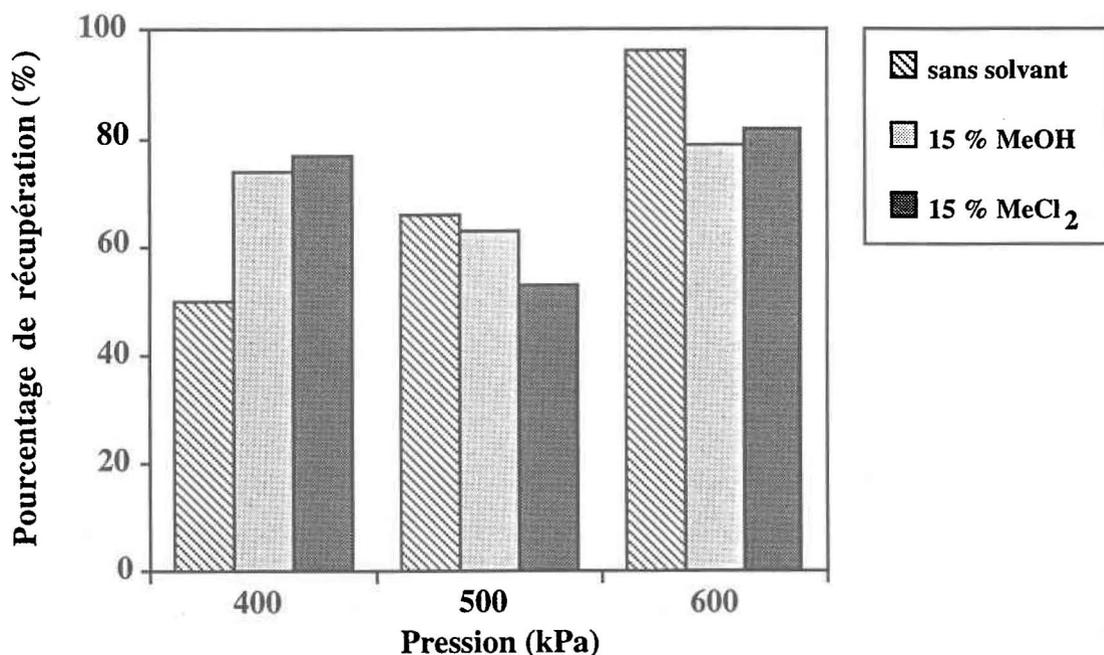


Figure 5.3: Pourcentage de récupération des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE en utilisant différents co-solvants (température: 100°C).

En fait, ce n'est que pour une pression de 400 kPa que l'ajout de co-solvant a eu pour effet d'améliorer le pourcentage de récupération. Pour cette valeur de pression, des pourcentages de

récupération de 50%, 74% et 77% ont été obtenus respectivement en absence de co-solvant, en présence de 15% de méthanol (MeOH) et en présence de 15% de dichlorométhane (MeCl<sub>2</sub>). Pour la comparaison entre eux des effets des deux co-solvants, des pourcentages de récupération semblables ont été obtenus, et ceci quelle que soit la pression utilisée. Que ce soit pour les HAP de 2, 3 et 4 anneaux ou de 5 et 6 anneaux, la présence des co-solvants a produit le même effet. En général, l'ajout de co-solvant n'a donc pas été avantageux pour la récupération des HAP. L'ajout de ceux-ci peut cependant être utile si des conditions de pression très faibles doivent être maintenues. Enfin, en absence de co-solvant, l'augmentation de la pression a eu pour effet d'augmenter le pourcentage de récupération des 16 HAP prioritaires (figure 5.3), tel que cela a été observé aux figures 5.1 et 5.2 pour une même température de 100°C.

### 5.2.1.2 Méthode en tubes

La figure 5.4 présente les résultats de l'extraction des 16 HAP prioritaires obtenus par la deuxième méthode étudiée, soit la méthode en tubes. Notons rapidement que cette méthode consiste à extraire les contaminants contenus dans le sol à l'aide d'un solvant (dichlorométhane; voir section 3.8.2).

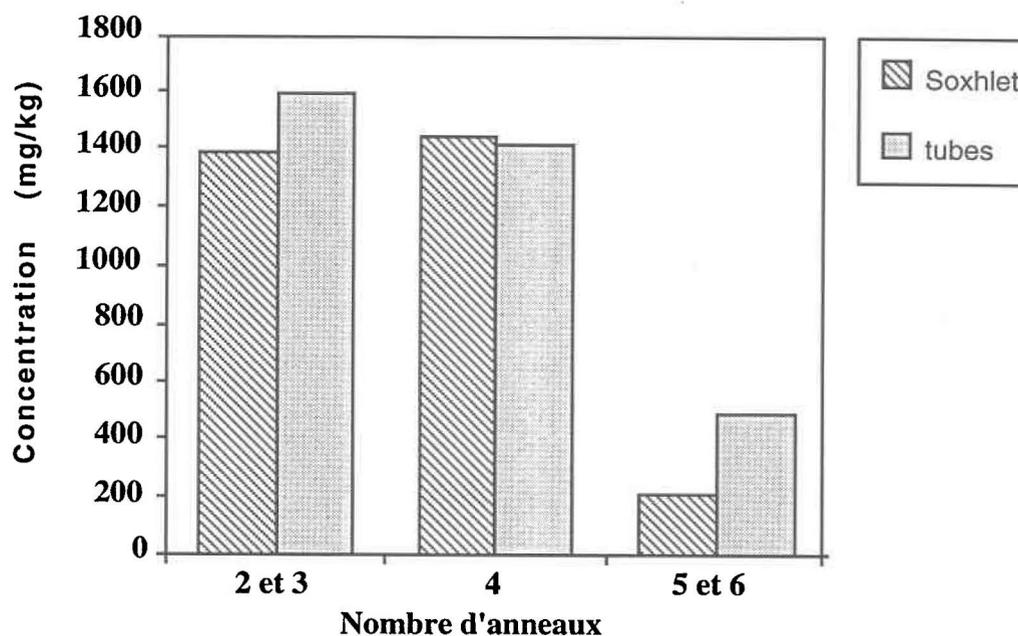


Figure 5.4: Récupération des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé par la méthode du Soxhlet et celle en tubes.

Cette figure montre que les concentrations obtenues pour les HAP formés de 2, 3 et 4 anneaux par la méthode en tubes (moyenne de trois répétitions) sont comparables à celles obtenues par la méthode standard du Soxhlet (moyenne de deux répétitions). En effet, une concentration résiduelle de 1600 mg/kg a été obtenue pour les HAP formés de 2 et 3 anneaux par la méthode en tubes, comparativement à une concentration de 1385 mg/kg obtenue par la méthode du Soxhlet. De même, des concentrations respectives de 1408 mg/kg et de 1445 mg/kg pour les HAP formés de 4 anneaux ont été obtenues. Pour les HAP formés de 5 et 6 anneaux, un rendement d'extraction supérieur a été obtenu pour la méthode en tubes (figure 5.4). En somme, un très bon rendement d'extraction pour l'ensemble des HAP a été obtenu par la méthode en tubes. Pour les 16 HAP prioritaires, une concentration totale de 3500 mg/kg a été obtenue par cette méthode en tubes, ce qui est comparable à la valeur de 3042 mg/kg obtenue par la méthode standard du Soxhlet.

### **5.2.2 Reproductibilité**

Afin de vérifier l'effet des agents tensioactifs sur la biodégradation des HAP présents dans le sol contaminé (chapitre 7), il importe avant tout de choisir une méthode d'extraction reproductible afin que les variations de concentrations en HAP obtenues pour les différents traitements ne soient pas dues à celles occasionnées par la méthode d'extraction utilisée. Le tableau 5.1 présente la comparaison des résultats obtenus de l'extraction des HAP par les trois différentes méthodes étudiées, soit la méthode standard du Soxhlet, la méthode au fluide supercritique (SFE) et la méthode en tubes. Les résultats montrent une bonne reproductibilité des méthodes au Soxhlet et en tubes. Par exemple et pour les HAP formés de 2, 3 et 4 anneaux, des déviations standards relatives de moins de 5% ont été obtenues avec ces deux méthodes. Contrairement à ces résultats, de grandes variations entre les 3 échantillons ont été obtenues avec la méthode SFE. En effet, des déviations standards relatives de plus de 20% ont été observées pour les HAP formés de 2, 3 et 4 anneaux. Pour les HAP formés de 5 et 6 anneaux, des déviations standards relatives plus importantes ont été obtenues pour les trois méthodes d'extraction. Cependant et dans ce cas, la meilleure reproductibilité a été obtenue avec la méthode en tubes.

Tableau 5.1: Récupération des HAP du sol contaminé à la créosote par trois différentes méthodes d'extraction (2 échantillons pour le Soxhlet; 3 échantillons pour le SFE et la méthode en tubes)

HAP	SOXHLET		SFE		TUBES	
	Conc. (mg/kg)	Dév. std (%)	Conc. (mg/kg)	Dév. std (%)	Conc. (mg/kg)	Dév. std (%)
naphthalène	114	1	17	89	65	2
acénaphthylène	17	0	8	91	72	0
acénaphthène	247	2	56	12	330	1
fluorène	181	2	286	18	258	2
phénanthrène	700	0	674	4	696	3
anthracène	126	2	129	23	179	1
fluoranthène	705	3	668	1	627	0
pyrène	485	2	454	7	451	1
benzo(a)anthracène	128	2	113	19	166	4
chrysène	127	2	132	10	164	0
benzo(b)fluoranthène	80	16	68	19	122	2
benzo(k)fluoranthène	48	33	58	13	103	1
benzo(a)pyrène	46	3	48	25	98	0
dibenzo(a,h)anthracène	3	110	27	66	19	141
indéno(1,2,3-cd)pyrène	24	18	22	47	80	6
benzo(g,h,i)pérylène	13	37	18	198	70	6

À cause du grand nombre de manipulations nécessaires pour la comparaison de la reproductibilité des trois méthodes d'extraction (tableau 5.1), un nombre restreint d'échantillons a été traité (2 échantillons pour le Soxhlet; 3 échantillons pour le SFE et la méthode en tubes). Il est cependant apparu évident, suite aux expérimentations qui ont été requises pour obtenir des résultats à partir de la méthode SFE, que cette méthode d'extraction était très peu reproductible et exigeait un développement méthodologique plus approfondi. Puisque la méthode en tubes apparaissait attrayante pour le traitement des nombreux échantillons de sol prélevés lors de l'expérience de biodégradation des HAP (chapitre 7), une expérience supplémentaire a donc été effectuée pour vérifier, avec un plus grand nombre d'échantillons, la reproductibilité de cette méthode. Pour cet essai, un échantillon de sol a été divisé en cinq fractions homogènes. Le tableau 5.2 présente les résultats obtenus pour l'extraction avec la méthode en tubes. Pour les 16 HAP prioritaires, une faible variation de la concentration entre les cinq échantillons est observée. En effet, des déviations standards relatives très acceptables ont été obtenues (moins de 10%, sauf dans le cas du benzo(k)fluoranthène: 11%). Ces résultats permettent donc de conclure que la méthode d'extraction en tubes est très reproductible pour les HAP étudiés.

Tableau 5.2: Récupération des HAP du sol contaminé à la créosote par la méthode en tubes sur cinq échantillons de sol

HAP	Concentration (mg/kg)					Dév. std (%)
	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	
naphtalène	44	40	42	50	47	7
acénaphthylène	28	31	32	31	35	6
acénaphthène	343	356	367	368	362	2
fluorène	252	264	274	278	274	3
phénanthrène	829	877	913	927	890	3
anthracène	155	200	174	173	168	8
fluoranthène	865	907	939	942	913	3
pyrène	602	628	642	657	642	3
benzo(a)anthracène	162	166	177	173	176	3
chrysène	167	178	187	187	178	4
benzo(b)fluoranthène	118	114	106	119	120	4
benzo(k)fluoranthène	79	104	82	104	97	11
benzo(a)pyrène	95	99	103	106	104	3
dibenzo(a,h)anthracène	35	36	38	31	32	7
indéno(1,2,3-cd)pyrène	73	75	89	88	85	7
benzo(g,h,i)pérylène	50	51	58	46	49	7

### 5.2.3 Effet des surfactants sur le rendement d'extraction de la méthode en tubes

#### 5.2.3.1 Analyse de variance

Afin de vérifier si la présence des agents tensioactifs pouvait affecter le rendement d'extraction de la méthode en tubes, les HAP de différents échantillons du sol contaminé et contenant ou non les surfactants ont été extraits et analysés: une analyse de variance a été appliquée sur les résultats obtenus. Seuls les 13 HAP prioritaires étudiés dans le chapitre 7 ont été traités ici. En fait, les sept traitements de l'expérience de biodégradation des HAP (chapitre 7) ont été étudiés dans les mêmes conditions soit: 1) absence de surfactant (sol + MSM); 2) sol + 10  $\mu\text{g/g}$  SDS; 3) sol + 100  $\mu\text{g/g}$  SDS; 4) sol + 500  $\mu\text{g/g}$  SDS; 5), 6) et 7) sol + surfactants de *P. aeruginosa* UG2 ajoutés aux trois mêmes concentrations. L'extraction a été effectuée suite à l'ajout des surfactants. Pour chacun des HAP, les concentrations des HAP obtenues pour les sept

traitements ont été comparées entre elles (trois réplicats étant effectués pour chacun des traitements). Pour 12 des 13 HAP prioritaires étudiés, les résultats de l'analyse de variance (tableau 5.3) ont montré qu'il n'y avait pas, pour un intervalle de confiance de 95%, de différence significative entre les résultats obtenus pour les sept différents traitements. En effet, seul le indéno(1,2,3-cd)pyrène ( $P = 0,032$ ) a montré une valeur de  $P$  inférieure à 0,05.

Tableau 5.3: Valeurs de  $P$  obtenues lors de la comparaison des concentrations des HAP extraits en présence et en absence des surfactants étudiés

HAP	Valeur de $P$
fluorène	0,119
phénanthrène	0,094
anthracène	0,619
fluoranthène	0,387
pyrène	0,380
benzo(a)anthracène	0,930
chrysène	0,597
benzo(b)fluoranthène	0,082
benzo(k)fluoranthène	0,540
benzo(a)pyrène	0,230
dibenzo(a,h)anthracène	NA*
indéno(1,2,3-cd)pyrène	0,032
benzo(g,h,i)pérylène	0,390

\* NA = non applicable car la variance n'est pas homogène.

En général, la présence de l'un ou l'autre des deux surfactants aux trois concentrations étudiées n'a donc pas eu d'effet significatif ( $P < 0,05$ ) sur le rendement de l'extraction des HAP par la méthode en tubes. Néanmoins et puisque seulement trois échantillons ont été analysés pour chacun des sept traitements, il faut interpréter avec prudence les résultats de l'analyse statistique.

### 5.2.3.2 Témoins abiotiques

L'effet de la présence des agents tensioactifs sur le rendement d'extraction de la méthode en tubes peut également être vérifié par l'étude des témoins abiotiques effectués dans l'expérience portant sur l'effet des agents tensioactifs sur la biodégradation des HAP (chapitre 7). En effet, l'étude de ces témoins abiotiques montre clairement que la présence des surfactants étudiés

n'affecte pas le rendement d'extraction des HAP par la méthode en tubes. Les figures 5.5 et 5.6 présentent respectivement les concentrations résiduelles (un seul échantillon par traitement) en phénanthrène et en pyrène dans le sol à trois temps différents lors de l'expérience de biodégradation des HAP (en début, à la mi-temps et en fin d'expérimentation). Les résultats montrent que, dans ces témoins abiotiques où les activités métaboliques sont inhibées et où les agents tensioactifs ajoutés en cours d'expérimentation (à toutes les deux semaines) se retrouvent accumulés dans le milieu, aucun effet attribuable à la présence des surfactants sur le rendement de l'extraction n'a été détecté (figures 5.5 et 5.6).

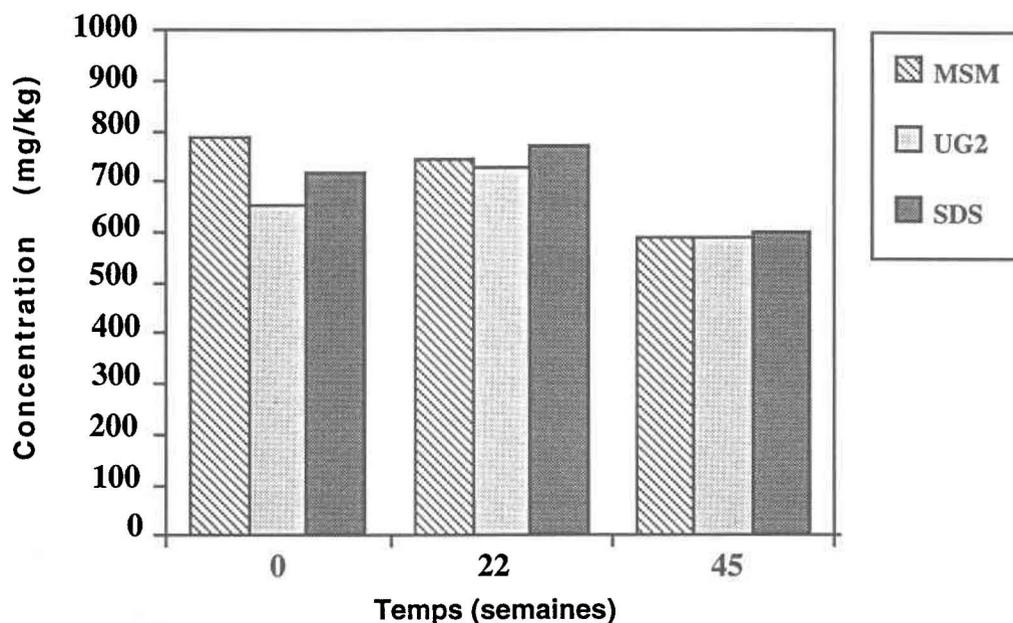


Figure 5.5: Concentrations résiduelles de phénanthrène dans le sol des témoins abiotiques.

Par exemple, même après 45 semaines d'incubation pendant lesquelles des agents tensioactifs ont été ajoutés à toutes les deux semaines, des concentrations résiduelles en phénanthrène de 590, 588 et 601 mg/kg ont été obtenues pour les milieux ayant été traités avec respectivement, aucun surfactant, 100  $\mu\text{g/g}$  de surfactants biologiques et 100  $\mu\text{g/g}$  de SDS. Des résultats similaires ont également été obtenus au début ainsi qu'après 22 semaines de traitement. Un seul exemple pour les HAP formés de 3 anneaux (phénanthrène, figure 5.5) et un seul pour les HAP de 4 anneaux (pyrène, figure 5.6) sont présentés ici: cependant, le même résultat a été obtenu

pour les autres HAP étudiés. Les agents tensioactifs utilisés n'auraient donc pas d'effet notable sur le rendement d'extraction des HAP par la méthode en tubes.

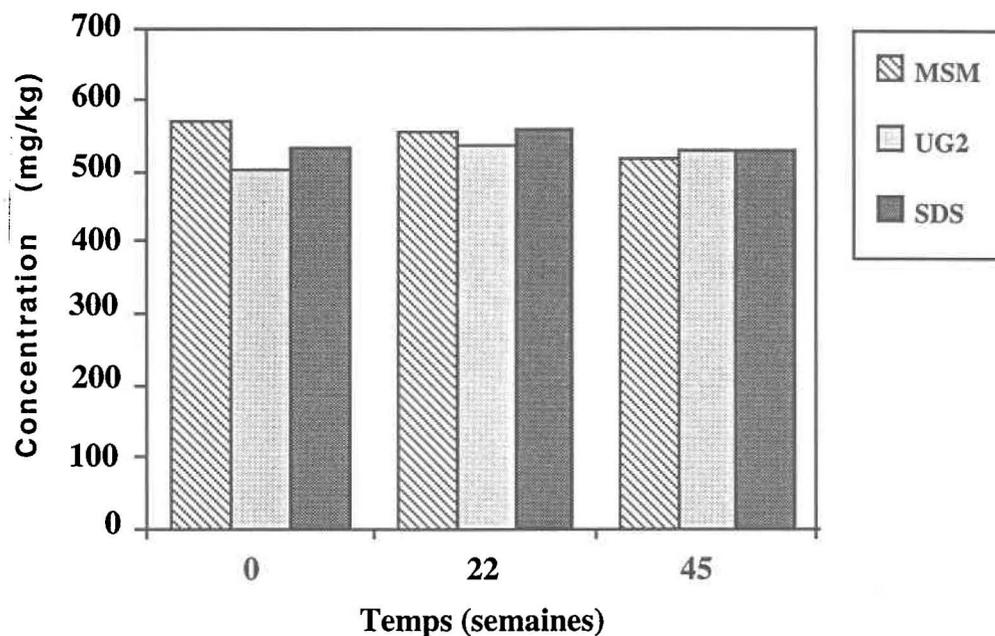


Figure 5.6: Concentrations résiduelles de pyrène dans le sol des témoins abiotiques.

### 5.3 Discussion

L'étude d'un sol réellement contaminé présente des difficultés comparativement à l'étude de systèmes reconstitués: le choix d'une méthode d'extraction des contaminants âgés qui soit efficace et reproductible est l'une de ces difficultés. La méthode standard du Soxhlet est bien documentée (méthode 3540, USEPA 1986). Cependant, cette méthode est à la fois laborieuse et longue à appliquer. Malgré une bonne efficacité d'extraction et une bonne reproductibilité, le nombre important d'échantillons à traiter lors des expériences effectuées dans le présent travail rend impossible le choix de cette méthode d'extraction. En comparaison avec cette dernière, le temps nécessaire à l'extraction des HAP par la méthode utilisant un fluide supercritique (SFE) est réduit de beaucoup. En effet, les 16 heures d'extraction requises par la méthode au Soxhlet sont remplacées par une durée de 30 à 90 minutes dans le cas de la méthode SFE. Pour cette dernière méthode et sous des conditions de température et de pression appropriées, un bon

rendement d'extraction a de plus été obtenu pour les HAP étudiés. Les résultats ont également montré que l'ajout de co-solvant n'a pas été avantageux pour les HAP étudiés. Pour les trois pressions étudiées, une augmentation de la température a amélioré l'extraction des HAP. Il a été toutefois observé que la récupération des HAP de 2, 3 et 4 anneaux par la méthode SFE à une pression de 600 kPa a été moins efficace à une température de 150°C qu'à une température de 100°C contrairement à ce qui a été observé pour les HAP de plus hautes masses molaires. Ce résultat s'explique probablement par une erreur expérimentale si on tient compte du fait qu'un seul essai a été effectué. Une répétition de l'expérience permettrait de mieux conclure sur ce sujet.

Cependant, la méthode d'extraction au SFE n'a pas été très reproductible et des expériences supplémentaires auraient été nécessaires pour permettre l'obtention d'une méthode appropriée pour le présent travail. Un tel développement méthodologique aurait cependant nécessité beaucoup plus de temps que celui accordé pour la réalisation des objectifs du projet. Pour ces raisons, la méthode d'extraction au fluide supercritique n'a pas été retenue.

À partir d'échantillons de sol contaminé, Wright et al. (1989) ont évalué la limite de détection ainsi que la reproductibilité de la méthode SFE utilisant le CO<sub>2</sub> comme fluide. De plus, ces auteurs ont comparé les résultats de cette méthode avec ceux obtenus par la méthode d'extraction au Soxhlet. Des résultats similaires à ceux obtenus dans le présent travail ont été montrés. En effet, des déviations standards relatives plus importantes ont été obtenues pour la reproductibilité des concentrations en HAP lors de l'utilisation de la méthode SFE. Néanmoins, d'autres travaux portant sur le développement de la méthode SFE pour l'extraction des contaminants présents dans des sols ont été publiés, et cette méthode semble être très prometteuse (Hawthorne et al. 1992; Hawthorne et Miller 1986; 1987; Lopez-Avila et al. 1990; Schantz et Chesler 1986).

La méthode d'extraction en tubes a montré une bonne efficacité d'extraction des HAP ainsi qu'une bonne reproductibilité. Cette dernière méthode est donc précise. Notons qu'une bonne reproductibilité était essentielle pour la validité des expériences de biodégradation des HAP décrites au chapitre 7. Du point de vue de l'exactitude, la méthode en tubes donne des résultats généralement supérieurs à ceux obtenus par la méthode du Soxhlet suggérant une meilleure efficacité d'extraction. Selon les résultats obtenus et dans les conditions étudiées, la méthode en tubes serait donc plus exacte que la méthode du Soxhlet. Notons que des études comparatives utilisant des ajouts dosés de contaminants et avec différents types de sols permettraient de

vérifier plus à fond cette affirmation. Finalement, la rapidité ainsi que la simplicité d'installation de la méthode en tubes a permis de réaliser les 24 extractions requises par l'essai de façon simultanée.

L'applicabilité d'une méthode d'extraction des HAP rapide et simple pour le cas des sols réellement contaminés a donc été démontrée dans le présent chapitre. En effet, les conditions d'extraction de la méthode en tubes ainsi que la comparaison de sa performance et de sa reproductibilité avec d'autres méthodes d'extraction (Soxhlet et SFE) représentent des résultats originaux qui, à la connaissance de l'auteur, ne sont pas retrouvés dans la littérature existante. En raison des résultats obtenus de ce développement, la méthode d'extraction en tubes a été choisie pour le suivi de la biodégradation des HAP dans le sol contaminé à la créosote.

## 5.4 Conclusions

En résumé, les principales conclusions qui peuvent être tirées des résultats obtenus dans le présent chapitre sont:

- Des rendements d'extraction des HAP de près de 100% ont été obtenus avec la méthode utilisant le CO<sub>2</sub> comme fluide supercritique. Une augmentation de la pression ou de la température d'extraction a, en général, pour effet l'amélioration du rendement de l'extraction tandis l'ajout de co-solvant n'a pas été avantageux pour les HAP étudiés.
- La méthode SFE n'a pas présenté une reproductibilité acceptable.
- La méthode en tubes est très reproductible
- La présence des deux agents tensioactifs étudiés n'affectent pas de façon significative l'efficacité d'extraction des HAP par la méthode en tubes
- L'applicabilité d'une méthode d'extraction simple et rapide a été démontrée

# CHAPITRE 6: EFFET DES SURFACTANTS SUR LA MOBILISATION DES HAP

---

## 6.1 Introduction

Dans le présent chapitre, la mobilisation des HAP contenus dans le sol contaminé à la créosote a été étudiée en présence de différentes concentrations de surfactants biologiques produits par la souche bactérienne *P. aeruginosa* UG2 et de SDS en solution. Les HAP étudiés dans ce chapitre sont les mêmes que ceux retrouvés dans le chapitre 7 (13 HAP). Le but de cette expérimentation était de vérifier le potentiel de ces deux agents tensioactifs à mobiliser des hydrocarbures très hydrophobes et âgés à partir d'un sol réellement contaminé. En fait, des études sur le sujet ont été réalisées par d'autres auteurs et plusieurs d'entre elles ont montré que l'utilisation de surfactants pour la mobilisation des contaminants hydrophobes était une approche prometteuse (Abdul et Gibson 1991; Ang et Abdul 1991; Aronstein et al. 1991). Des travaux montrant le potentiel des surfactants biologiques produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 et celui du SDS pour augmenter la mobilisation des composés hydrophobes ont déjà été publiés (Roy et al. 1994; Van Dyke et al. 1993b; Scheibenbogen 1994). Rappelons également que les agents tensioactifs de *P. aeruginosa* UG2 avaient été comparés à 12 autres surfactants biologiques et ceux produits par la souche en question avaient donné les meilleurs résultats pour la solubilisation de l'hexachlorobiphényle (Van Dyke et al. 1993a). Puisque la plupart des études portant sur le sujet ont été réalisées dans des systèmes reconstitués dans lesquels les contaminants ont été préalablement ajoutés dans le sol et puisqu'un nombre restreint d'études ont utilisé des sols réellement contaminés, il était intéressant de vérifier l'effet de ces agents tensioactifs sur la mobilisation de contaminants adsorbés sur le sol depuis des années. Considérant ce dernier point, les résultats obtenus dans le présent chapitre constituent donc des données importantes tant d'un point de vue pratique que scientifique. Compte tenu de la quantité d'eau requise pour l'obtention d'une quantité adéquate de phase aqueuse extraite nécessaire à l'analyse des contaminants mobilisés, des conditions expérimentales cependant différentes de celles utilisées dans le chapitre 7 (biodégradation des HAP en phase solide) ont dû être effectuées.

## 6.2 Résultats

Afin de vérifier la mobilisation des HAP contenus dans le sol contaminé, ce dernier a été incubé en présence de solutions aqueuses contenant différentes quantités de l'un ou de l'autre des deux surfactants étudiés (voir section 3.7). Après l'incubation, la phase aqueuse a été extraite par filtration et les HAP contenus dans cette dernière ont été récupérés par micro-extraction liquide-liquide. Les HAP ont ensuite été analysés.

Notons d'abord que chacune des figures et chacun des tableaux présentés dans ce chapitre montrent les résultats obtenus pour un essai. Cependant, les mêmes tendances ont été obtenues avec les deux autres répétitions qui ne sont pas présentées. L'effet de différentes concentrations de SDS en solution sur la mobilisation de trois HAP formés de 3 anneaux et de 2 HAP formés de 4 anneaux est présenté à la figure 6.1. Les résultats montrent que le SDS a été efficace pour mobiliser ces HAP adsorbés sur le sol contaminé. Par exemple, la concentration du pyrène obtenue dans la phase aqueuse extraite est passée de 0,04 mg/l en absence de surfactant à 21,6 mg/l en présence de 1% (p/v) de SDS. À partir d'une concentration de SDS de 0,25% (p/v) et plus, on observe une importante augmentation de la concentration des 5 HAP représentés. Notons cependant qu'une légère augmentation de la concentration du phénanthrène, fluoranthène et du pyrène dans la phase aqueuse extraite a également été observée à une concentration de 0,1% SDS. Cette augmentation de la mobilisation des HAP à partir de concentrations en SDS de 0,1% à 0,25% concorde approximativement avec la CMC de 0,15% déterminée au chapitre 4. Ceci correspond également assez bien avec la CMC de 0,23% retrouvée dans la littérature (Clarke et al. 1992).

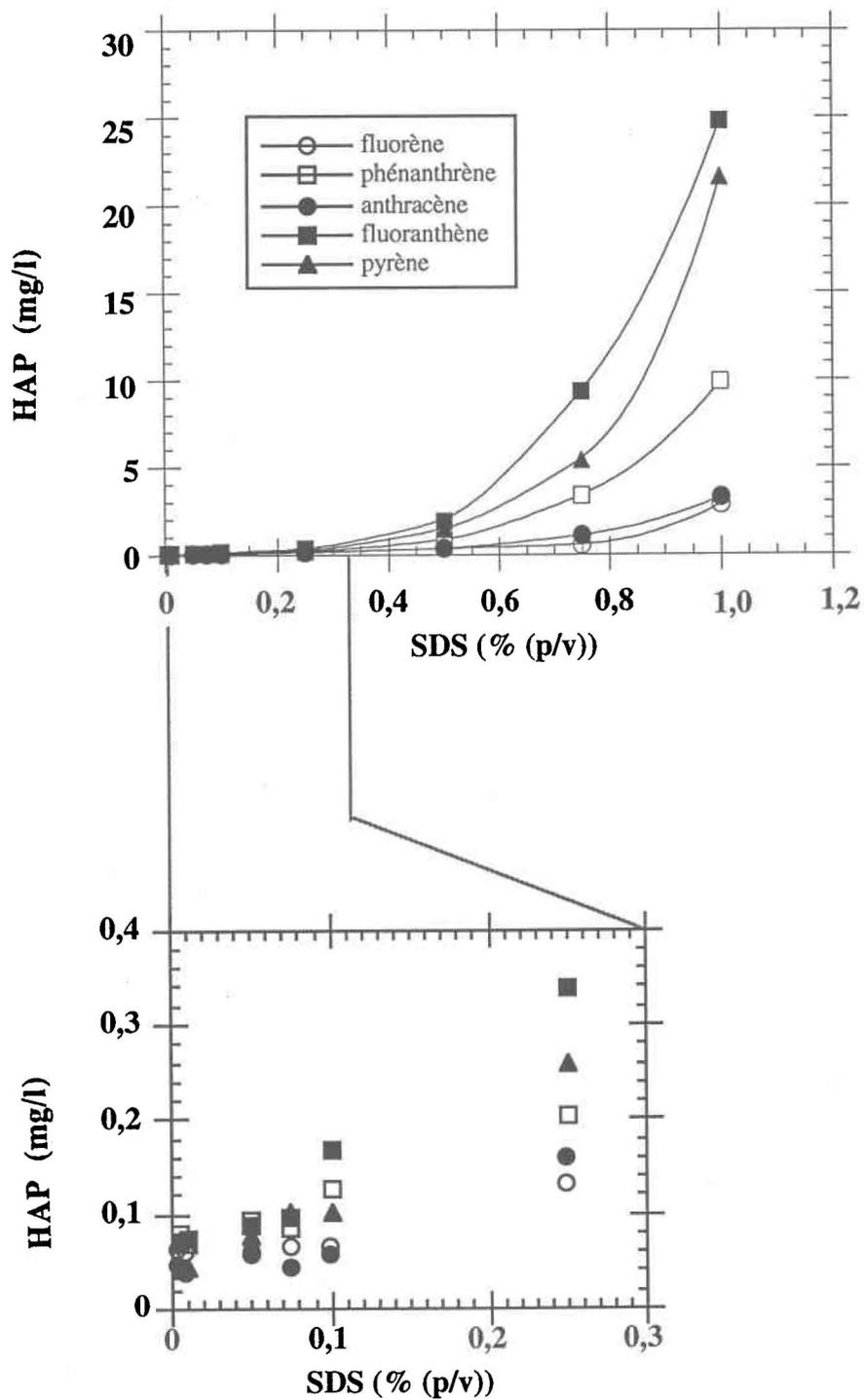


Figure 6.1: Mobilisation des HAP contenus dans un sol contaminé à la créosote par différentes concentrations de SDS.

La figure 6.2 présente les résultats obtenus avec les agents tensioactifs produits par la souche *P. aeruginosa* UG2. Des résultats semblables à ceux obtenus en présence de SDS y sont observés. En comparaison avec le SDS, les résultats montrent une plus grande efficacité des surfactants biologiques à mobiliser les différents HAP.

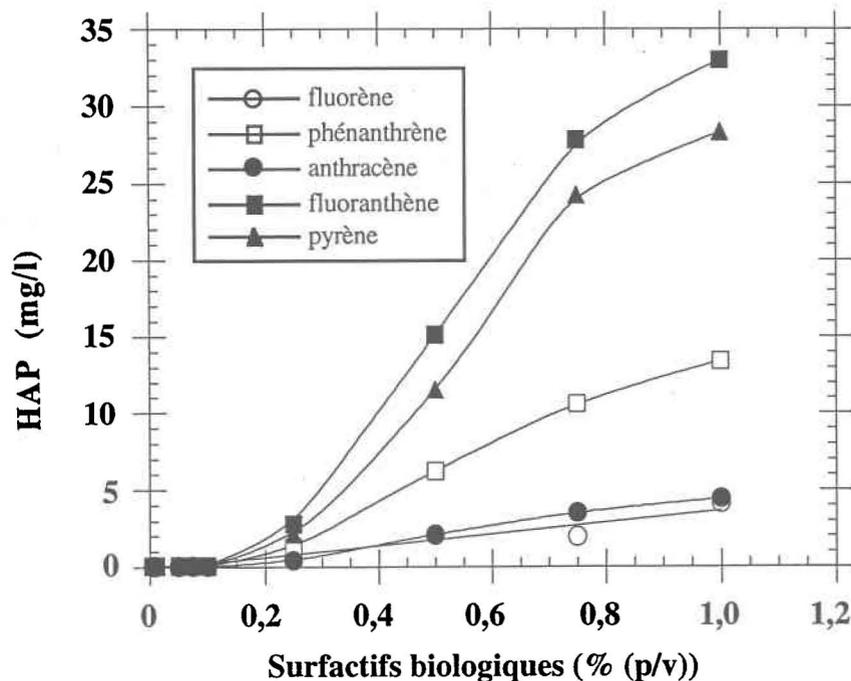


Figure 6.2: Mobilisation des HAP contenus dans un sol contaminé à la créosote par différentes concentrations de surfactants biologiques.

Par exemple et à une concentration de 1% (p/v) de surfactants biologiques, une concentration de pyrène de 28,3 mg/l a été retrouvée dans la phase aqueuse extraite, comparativement à 21,6 mg/l pour une même concentration de SDS. Ce résultat s'explique par le fait que les surfactants biologiques de *P. aeruginosa* UG2 possèdent une CMC plus faible que celle du SDS (chapitre 4). Il est à noter que cette plus grande efficacité obtenue avec les surfactants biologiques est observée pour tous les autres HAP représentés à la figure 6.2. Cependant et malgré une CMC (0,003 g/l, Van Dyke et al. 1993b) beaucoup plus petite que celle du SDS, aucune augmentation importante de la concentration des HAP en phase aqueuse n'est observée à des concentrations en agents tensioactifs biologiques inférieures à 0,25%. Enfin, et en présence de l'un ou l'autre des

deux surfactants étudiés, on observe une augmentation plus importante de la mobilisation des HAP formés de 4 anneaux (pyrène et fluoranthène), comparativement à celle des HAP formés de 3 anneaux.

La figure 6.3 présente l'efficacité des deux agents tensioactifs à augmenter la concentration des HAP en phase aqueuse par rapport à celle obtenue dans l'eau sans surfactants. Cette représentation des résultats permet de quantifier l'augmentation de la mobilisation attribuable à la présence de chacun des deux agents tensioactifs étudiés. Par exemple, la présence de 1% de SDS en solution a eu pour effet d'augmenter d'environ 560 fois la concentration du fluoranthène dans la phase aqueuse extraite. La figure 6.3 permet également de comparer entre elles les efficacités des deux surfactants étudiés. Tel qu'observé précédemment, les résultats montrent que les agents tensioactifs biologiques ont été plus efficaces que le SDS à augmenter la mobilisation des HAP présentés, et ceci pour les concentrations (de 0,25% et plus) en surfactants étudiées. Par exemple, et en présence de 1% de SDS, la concentration de fluorène est près de 40 fois supérieure à celle obtenue en absence de surfactant. Cette concentration a toutefois été augmentée de 60 fois en présence de la même concentration d'agents tensioactifs biologiques. Pour les HAP formés de 3 anneaux, c'est à une concentration de 0,5% de surfactants que la différence entre les concentrations de HAP obtenues pour chacun des deux agents tensioactifs utilisés est la plus importante. En effet à cette concentration de surfactants, les concentrations de fluorène, phénanthrène et anthracène obtenues en présence de surfactants biologiques sont environ de 6 à 8 fois supérieures à celles obtenues en présence de SDS. De même, un rapport de 8 est obtenu aux concentrations à la fois de 0,25% et de 0,5%, ceci pour le fluoranthène et le pyrène. Cependant et pour des concentrations de surfactants supérieures à 0,5%, l'écart observé entre les efficacités des deux agents tensioactifs diminue, l'efficacité du SDS à mobiliser les HAP augmentant plus rapidement en fonction de la concentration de surfactant que celle des agents tensioactifs biologiques. Par exemple, la concentration du fluorène en présence de 1% de surfactants biologiques n'est seulement que 1,4 fois plus grande que celle retrouvée en présence de la même concentration de SDS. Ceci traduit l'allure des différentes courbes obtenues pour la mobilisation des HAP en présence des deux surfactants (figures 6.1 et 6.2).

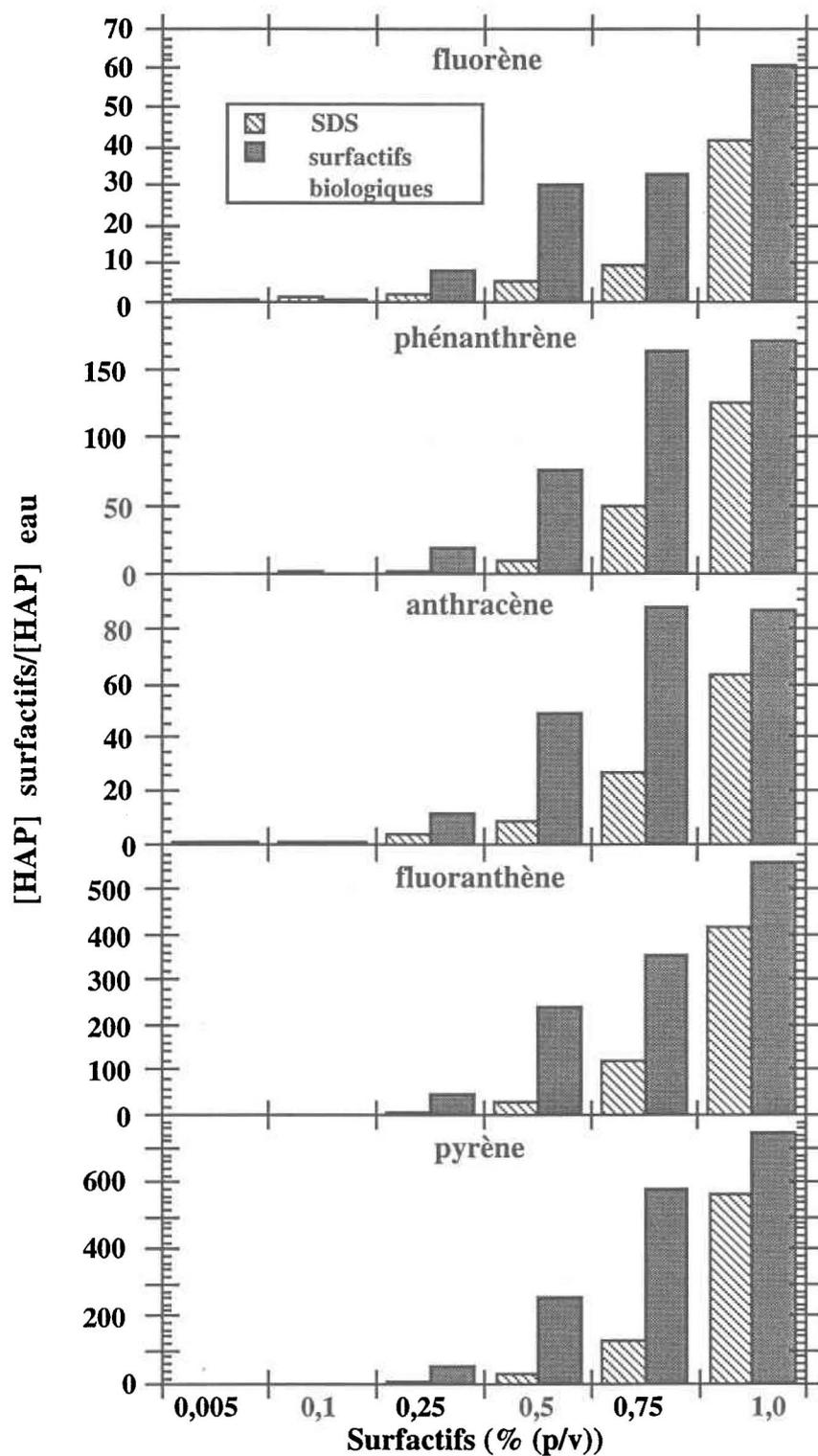


Figure 6.3: Effet de la concentration de surfactants sur le ratio concentration des HAP dans la phase aqueuse en présence des surfactants/concentration des HAP dans l'eau.

À l'opposé du fluoranthène et du pyrène, les deux autres HAP formés de 4 anneaux (benzo(a)anthracène et chrysène) n'ont pas été détectés dans la phase aqueuse extraite en absence de surfactants. Ceci peut s'expliquer par les faibles valeurs de solubilité pour ces deux HAP (respectivement de 0,014 et de 0,002 mg/l), comparativement à celles présentées par le fluoranthène et le pyrène (respectivement de 0,26 mg/l et de 0,135 mg/l) (Dzombak et Luthy 1984). En effet, la limite de détection est approximativement de 0,015 mg/l pour les analyses effectuées: ces HAP ne peuvent donc pas être détectés dans l'eau avec la méthode analytique employée. Il en est de même pour tous les HAP formés de 5 anneaux et plus qui présentent des solubilités inférieures à cette limite de détection.

Les tableaux 6.1 et 6.2 présentent, respectivement pour le SDS et pour les surfactants biologiques, les résultats obtenus pour ces HAP non retrouvés dans l'eau en absence de surfactants. Même si aucune concentration de ces HAP n'a été détectée pour des concentrations en surfactants inférieures à 0,1%, les résultats montrent que l'augmentation de la concentration de l'un ou l'autre des deux agents tensioactifs (au-delà de 0,1%) a pour effet d'augmenter la mobilisation des HAP de masse molaire élevée qui sont normalement très peu solubles dans l'eau.

Tableau 6.1: Concentrations des HAP de masse molaire élevée retrouvées dans la phase aqueuse extraite après mobilisation par différentes concentrations de SDS

HAP ( $\mu\text{g/l}$ )	Concentrations de SDS (% (p/v))						Critère C <sup>(c)</sup> de l'eau souterraine ( $\mu\text{g/l}$ )
	0 à 0,075 <sup>(a)</sup>	0,1	0,25	0,5	0,75	1	
benzo(a)anthracène	ND <sup>(b)</sup>	29	83	284	1179	4271	2
chrysène	ND	29	91	328	1300	4020	5
benzo(b)fluoranthène	ND	28	89	244	838	2490	1
benzo(k)fluoranthène	ND	21	65	178	634	1946	1
benzo(a)pyrène	ND	17	60	153	581	1801	1
indéno(1,2,3-cd)pyrène	ND	6	47	96	272	851	5
dibenzo(a,h)anthracène	ND	ND	ND	43	ND	343	1
benzo(g,h,i)pérylène	ND	8	46	83	216	708	1
total des 16 HAP							50

(a) 0; 0,005; 0,01; 0,05 et 0,075% SDS

(b) ND: concentration non détectable (limite de détection près de 15  $\mu\text{g/l}$ )

(c) MENVIQ 1988

Tableau 6.2: Concentrations des HAP de masse molaire élevée retrouvées dans la phase aqueuse extraite après mobilisation par différentes concentrations de surfactants biologiques

HAP ( $\mu\text{g/l}$ )	Concentrations de surfactants biologiques (% (p/v))						Critère C <sup>(c)</sup> de l'eau souterraine ( $\mu\text{g/l}$ )
	0 à 0,075 <sup>(a)</sup>	0,1	0,25	0,5	0,75	1	
benzo(a)anthracène	ND <sup>(b)</sup>	13	466	2072	3288	5569	2
chrysène	ND	13	531	2448	3844	5200	5
benzo(b)fluoranthène	ND	15	347	1575	2381	2922	1
benzo(k)fluoranthène	ND	ND	251	1130	1623	2312	1
benzo(a)pyrène	ND	ND	218	1023	1467	2135	1
indéno(1,2,3-cd)pyrène	ND	ND	118	627	623	956	5
dibenzo(a,h)anthracène	ND	ND	58	347	ND	400	1
benzo(g,h,i)pérylène	ND	ND	97	532	501	767	1
total des 16 HAP							50

(a) 0; 0,005; 0,01; 0,05 et 0,075% surfactants biologiques

(b) ND: concentration non détectable (limite de détection près de 15  $\mu\text{g/l}$ )

(c) MENVIQ 1988

Le SDS et les surfactants biologiques étudiés sont donc efficaces pour mobiliser les composés organiques très hydrophobes. En effet et malgré des solubilités extrêmement faibles dans l'eau seule, une concentration relativement élevée de ces HAP en phase aqueuse a été obtenue en présence des surfactants. Par exemple, le benzo(g,h,i)pérylène, qui présente la plus faible solubilité des HAP étudiés (0,00026 mg/l), a été retrouvé à une concentration de 0,767 mg/l en présence d'une solution de 1% (p/v) de surfactants biologiques. La solubilité apparente de ce HAP est donc au moins 2900 fois plus grande que la solubilité théorique dans l'eau, lorsque mis en présence de l'agent tensioactif. Finalement, les tendances observées précédemment pour les HAP de faible masse molaire sont également retrouvées dans le cas des HAP de masse molaire élevée. En effet, des concentrations plus élevées de HAP lourds dans la phase aqueuse extraite ont été obtenues en présence des agents tensioactifs biologiques, et ceci pour les concentrations de surfactant étudiées supérieures à 0,1%.

Finalement, il est intéressant de noter qu'en présence des deux agents tensioactifs étudiés, d'importantes concentrations de HAP ont été obtenues en phase aqueuse et que, conséquemment, le critère C (MENVIQ 1988) pour la qualité des eaux souterraines a été

largement dépassé dans de nombreux cas (tableaux 6.1 et 6.2). L'eau ainsi obtenue est donc sérieusement contaminée par les HAP. Elle est considérée comme non potable et sujette à une restauration.

Les tableaux 6.3 et 6.4 présentent les quantités de HAP qui sont retrouvées dans le sol après le lavage de ce dernier avec 1% de SDS et 1% de surfactants biologiques, respectivement. Les résultats montrent que de faibles pourcentages d'enlèvement ont été obtenus par rapport à la concentration initiale en HAP. Par exemple, pour le pyrène, seulement 11% de la quantité de pyrène retrouvé initialement dans le sol a été enlevée par la présence de 1% de SDS. En effet, la concentration initiale est passée de 485 mg/kg à 430 mg/kg après l'incubation du sol en présence du SDS. Ces pourcentages qui sont très faibles sont cependant peu comparables à ceux retrouvés en absence de surfactants. En fait, en absence de surfactants, seulement 0,02% de la quantité de pyrène retrouvé initialement dans le sol a été enlevée par l'eau seule. En comparaison avec le surfactant chimique, les surfactants biologiques ont montré une efficacité de lavage plus élevée. En effet et pour le même exemple, un pourcentage d'enlèvement de près de 15% a été obtenu en présence de ces derniers.

Tableau 6.3: Pourcentages d'enlèvement des HAP contenus dans le sol obtenus en présence de 1% (p/v) de SDS

HAP	Concentrations des HAP dans le sol avant et après incubation		
	avant (mg/kg)	après <sup>(a)</sup> (mg/kg)	% d'enlèvement
fluorène	181	174	4
phénanthrène	700	675	4
anthracène	126	118	7
fluoranthène	705	642	9
pyrène	485	430	11
benzo(a)anthracène	128	117	8
chrysène	127	117	8
benzo(b)fluoranthène	80	74	8
benzo(k)fluoranthène	48	43	10
benzo(a)pyrène	46	41	10
indéno(1,2,3-cd)pyrène	24	22	9
dibenzo(a,h)anthracène	3	2	29
benzo(g,h,i)pérylène	13	11	14

<sup>(a)</sup> calculé d'après les concentrations obtenues dans la phase aqueuse

Tableau 6.4: Pourcentages d'enlèvement des HAP contenus dans le sol obtenus en présence de 1% (p/v) de surfactants biologiques

HAP	Concentrations des HAP dans le sol avant et après incubation		
	avant (mg/kg)	après <sup>(a)</sup> (mg/kg)	% d'enlèvement
fluorène	181	171	6
phénanthrène	700	666	5
anthracène	126	115	9
fluoranthène	705	622	12
pyrène	485	413	15
benzo(a)anthracène	128	114	11
chrysène	127	114	10
benzo(b)fluoranthène	80	73	9
benzo(k)fluoranthène	48	42	12
benzo(a)pyrène	46	41	12
indéno(1,2,3-cd)pyrène	24	22	10
dibenzo(a,h)anthracène	3	2	34
benzo(g,h,i)pérylène	13	11	15

(a) calculé d'après les concentrations obtenues dans la phase aqueuse

### 6.3 Discussion

Dans le présent chapitre, les résultats ont montré que les deux agents tensioactifs étudiés ont été efficaces pour augmenter la mobilisation des HAP contenus dans un sol contaminé à la créosote. En effet et en présence de ces surfactants, des HAP de masse molaire élevée et hautement hydrophobes ont été retrouvés en phase aqueuse. Dans la littérature, il existe des études portant sur la mobilisation des composés hydrophobes par les surfactants produits par la souche *P. aeruginosa* UG2. Tout d'abord, les résultats de Van Dyke et al. (1993a) ont montré que le filtrat d'une culture de 7 jours de la souche bactérienne pouvait augmenter la concentration de biphényle polychlorés, ainsi que celle d'un mélange d'hydrocarbures, en phase aqueuse d'un système sol/eau. Dans une seconde étude, la solubilisation de composés hydrophobes tels que les HAP par différentes concentrations en surfactants biologiques partiellement purifiés a été vérifiée (Van Dyke et al. 1993b). Les résultats ont montré une augmentation de la solubilisation des composés étudiés avec celle de la concentration en surfactants biologiques. Enfin et dans

une étude récente, Scheibenbogen et al. (1994) ont montré, par des essais en colonne de sol, l'efficacité des agents tensioactifs produits par la même souche bactérienne pour la mobilisation d'un mélange d'hydrocarbures à partir d'un sol fraîchement contaminé.

Dans ce chapitre, l'efficacité du SDS et des surfactants de *P. aeruginosa* UG2 à mobiliser les HAP contenus dans le sol contaminé par la créosote a été vérifiée. L'effet de ces agents tensioactifs biologiques sur la mobilisation des HAP adsorbés depuis longtemps dans un sol contaminé (résidus âgés) n'avait jusqu'à maintenant pas été vérifié dans la littérature, et ceci même si des résultats avaient déjà montré que le temps de contact des HAP avec le sol pouvait influencer le pouvoir de mobilisation des contaminants par ces surfactants biologiques. À ce sujet, Van Dyke et al. (1993b) ont montré qu'une augmentation du temps d'incubation du [<sup>14</sup>C]phénanthrène avec le sol, avant l'addition des surfactants biologiques, avait pour effet de diminuer l'efficacité de ces surfactants. En effet, un pourcentage de récupération du phénanthrène de 38%, déterminé lorsque ce HAP a été mis en contact durant une heure avec le sol puis durant deux heures avec les agents tensioactifs, a été abaissé à 27% lorsque le HAP a été mis en contact avec le sol pour une plus grande période de temps (24 heures), et ceci malgré un temps de contact de 24 heures avec les surfactants biologiques.

Dans le présent travail, les résultats ont montré que l'augmentation de la mobilisation des HAP par le SDS se produit à des valeurs de concentration en SDS près de la CMC et au-dessus de cette dernière. Des résultats semblables ont été obtenus dans une étude (Roy et al. 1994) dans laquelle l'anthracène, ajouté dans une colonne de sable, n'a pas été efficacement mobilisé par des solutions de SDS en concentrations inférieures à celle de la CMC. Ces résultats montrent que l'augmentation de la solubilisation produite par la présence du SDS est principalement due à la formation de micelles dans le milieu. Le contaminant se distribue donc principalement entre la matière organique du sol et le centre hydrophobe de la micelle (Jafvert 1991). Pour les agents tensioactifs biologiques étudiés et malgré une CMC mesurée de 0,03 g/l, aucune augmentation apparente de la concentration des HAP en phase aqueuse ne fut observée à des concentrations en surfactants inférieures à 1 - 2,5 g/l. L'adsorption des surfactants biologiques sur le sol peut expliquer en partie ces résultats obtenus. En effet, une grande adsorption des agents tensioactifs produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 sur le sol a été montrée au chapitre 4. Les molécules de surfactants qui se retrouvent adsorbées sur le sol ne sont donc plus disponibles pour la formation de micelles dans la phase aqueuse, et ceci diminue la mobilisation des composés hydrophobes qui s'effectue via le processus de micellisation. Notons que d'autres auteurs (Van

Dyke et al. 1993b) ont suggéré que l'adsorption des mêmes agents tensioactifs sur le sol était la principale raison pour laquelle de grandes quantités de surfactants biologiques étaient requises pour l'obtention d'une bonne efficacité de solubilisation.

Comparativement au SDS, les surfactants de *P. aeruginosa* ont été plus efficaces pour la mobilisation des HAP étudiés. Des résultats semblables ont également été montrés dans la littérature. En effet, une plus grande quantité de [<sup>14</sup>C]phénanthrène et de [<sup>14</sup>C] 2,2',5,5' tétrachlorobiphényle a été récupérée en phase aqueuse contenant les mêmes surfactants biologiques (rhamnolipides) que dans celle contenant une même quantité de SDS (Van Dyke et al. 1993b). Ces résultats peuvent s'expliquer par une CMC pour les surfactants biologiques beaucoup plus basse que celle pour le SDS. Les monomères de surfactants biologiques sont donc plus portés à s'associer entre eux pour former des micelles et la plupart des molécules de surfactants se retrouvent en phase micellaire (Thangamani et Shreve 1994). La formation d'un nombre plus élevé de micelles, ou de micelles avec un nombre d'agrégation plus élevé, est alors obtenue avec les agents tensioactifs biologiques. Même si une mobilisation des HAP par les surfactants biologiques n'est obtenue qu'à une concentration en surfactants de beaucoup supérieure à la CMC à cause de l'adsorption des monomères de surfactants sur le sol, une fois que la concentration en surfactants biologiques permettant la formation de micelles a été atteinte dans le milieu, les micelles permettent alors une plus grande mobilisation de composés hydrophobes. Dans une étude récente (Thangamani et Shreve 1994), l'efficacité des rhamnolipides à solubiliser l'hexadécane dans différents systèmes a été vérifiée, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus en présence d'alkyle benzène sulfonate, un surfactant anionique synthétique. Les résultats ont montré, en présence des rhamnolipides, un rapport molaire de mobilisation pour l'hexadécane (moles d'hexadécane solubilisé/mole de surfactant) 20 fois supérieur à celui obtenu en présence de l'agent tensioactif synthétique. Les auteurs ont suggéré que les différences dans la structure des micelles des deux surfactants étaient responsables des résultats obtenus. En effet, il est suggéré que le SDS formerait des micelles de forme sphérique, tandis que les rhamnolipides formeraient des micelles contenant moins de monomères de surfactants à cause de la plus grande surface des groupes actifs (hydrophiles et hydrophobes). Ce type de micelle à faible densité de monomères de surfactant serait capable de capter une plus grande quantité d'hexadécane, ce qui permettrait une plus grande solubilisation apparente de l'hydrocarbure. De plus et puisque ce type de micelle est caractéristique des micelles formées par les surfactants non-ioniques, ceci expliquerait les rendements de solubilisation élevés généralement obtenus avec les agents tensioactifs non-ioniques (Martel et al. 1993). Des études

sur les caractéristiques des micelles formées par les surfactants étudiés doivent être réalisées pour mieux comprendre les mécanismes impliqués.

Les résultats ont également montré, pour les deux agents tensioactifs étudiés et pour les HAP formés de 3 et 4 anneaux, une mobilisation plus importante pour le fluoranthène et le pyrène. Ces derniers sont considérés, comparativement aux autres HAP étudiés et formés de 3 anneaux, comme étant plus hydrophobes (valeur plus élevée de  $K_{ow}$ ). En fait, le processus de "solubilisation" à l'intérieur des micelles implique la "solubilisation" des contaminants hydrophobes dans la phase non polaire créée par le centre de la micelle. Une corrélation peut donc ainsi exister entre la valeur de  $K_{ow}$  d'un contaminant hydrophobe et son coefficient de partage micelle/eau (Clarke et al. 1992). En résumé, plus un composé est hydrophobe, plus il sera disposé à se "solubiliser" dans la région hydrophobe de la micelle.

Enfin, les résultats ont montré que, malgré la quantité importante de HAP retrouvée dans la phase aqueuse après l'incubation du sol en présence des surfactants étudiés, seulement une faible proportion des HAP contenus initialement dans le sol a été enlevée. Il doit être noté ici que l'expérience qui a été effectuée dans le présent travail n'avait point pour but de démontrer l'efficacité de lavage d'un sol par les surfactants. Si un tel but avait été poursuivi, des lavages consécutifs auraient été effectués. Une plus grande quantité de phase aqueuse aurait également été utilisée. En effet, la phase aqueuse peut devenir saturée en micelles et en HAP solubilisés et afin d'optimiser une technique de lavage de sol, la phase aqueuse doit être renouvelée périodiquement. Les résultats obtenus dans le présent travail permettent donc de faire une comparaison entre les quantités de HAP retrouvées dans les phases aqueuses en présence et en absence de surfactants et permettent également de comparer entre eux les deux surfactants étudiés.

Un des principaux problèmes associés aux techniques de lavage des sols par les agents tensioactifs est le possible colmatage des pores du sol par ces derniers. Il en résulte ainsi une diminution de la conductivité hydraulique et cet effet, qui peut devenir important selon le surfactant choisi, devrait être pris en considération avant la réalisation d'une application *in situ* (Allred et Brown 1994). Dans une étude récente, l'efficacité des agents tensioactifs produits par la même souche bactérienne pour le traitement d'un sol fraîchement contaminé a été démontrée par des essais en colonne de sol (Scheibenbogen et al. 1994). En plus d'une mobilisation efficace du mélange d'hydrocarbures ajouté, aucun colmatage des pores du sol ne fut observé, la

solution de surfactants biologiques continuellement injectée circulant librement dans la colonne. Ces résultats montrent ainsi le potentiel des agents tensioactifs biologiques pour leur emploi en conditions *in situ*. Dans le présent travail, l'efficacité des mêmes surfactants biologiques pour la mobilisation des composés hydrophobes a été montrée dans le cas d'un sol réellement contaminé depuis longtemps (résidus âgés). L'utilisation des agents tensioactifs produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 pour les technologies de traitement de sols semble donc très prometteuse.

Finalement, d'autres recherches sont effectuées dans le domaine afin d'améliorer l'efficacité de mobilisation des contaminants et de limiter les problèmes de colmatage des pores du sol et de pertes de surfactants par précipitation dans le sol, pertes qui sont importantes dans le cas des agents tensioactifs anioniques tels que le SDS (Jafvert et Heath 1991). Parmi ces recherches, certains additifs tels que alcools et pyrophosphate de sodium sont étudiés pour augmenter l'efficacité de mobilisation (Martel et al. 1993; Scheibenbogen et al. 1994). Des mélanges de différents surfactants (ex.: non-ioniques) et même de différents types de surfactants (ex.: non-ioniques+anioniques) sont également étudiés afin de limiter l'adsorption ou la précipitation des surfactants. En effet, plus la CMC d'un surfactant ou d'un mélange de surfactants est diminuée, moins grande est la tendance de l'agent tensioactif à précipiter (West et Harwell 1992): à cet égard un mélange de surfactants anionique et non-ionique possède en général une CMC moins élevée que celles des surfactants seuls. Ces mélanges de surfactants permettraient de plus d'améliorer l'écoulement de l'eau et l'efficacité de mobilisation des contaminants (Allred et Brown 1994).

En somme, les agents tensioactifs biologiques ont montré un bon potentiel pour la mobilisation des contaminants hydrophobes. Cependant certains facteurs importants tel que le coût de production à grande échelle doivent être évalués afin de pouvoir déterminer le potentiel réel de l'utilisation des agents tensioactifs biologiques d'un point de vue applicabilité sur le terrain.

## 6.4 Conclusions

En résumé, les principales conclusions qui peuvent être tirées des résultats obtenus dans le présent chapitre sont:

- Les deux agents tensioactifs ont été efficaces pour mobiliser plusieurs HAP présents dans un sol contaminé par la créosote y compris les HAP de très haute masse molaire.
- L'augmentation de la mobilisation des HAP par les surfactants étudiés a varié dépendamment du HAP étudié et de la concentration de surfactants utilisée.
- Pour tous les HAP étudiés et pour une même concentration en surfactants, les agents tensioactifs biologiques ont été plus efficaces que le SDS

# CHAPITRE 7: EFFET DES SURFACTANTS SUR LA BIODÉGRADATION DES HAP

---

## 7.1 Introduction

Dans ce chapitre, la biodégradation des HAP dans un sol contaminé à la créosote a été étudiée en présence de différentes concentrations de l'un ou de l'autre des deux agents tensioactifs utilisés. Dans la littérature, les résultats obtenus d'études portant sur le sujet sont assez diversifiés et parfois contradictoires. En effet, certains résultats montrent que les agents tensioactifs peuvent augmenter la biodégradation des contaminants hydrophobes, tandis que d'autres suggèrent que la présence de surfactants n'a pas d'effet sur le rendement d'un biotraitement par voie aérobie. Par ailleurs, des études ont montré que la présence de surfactants pouvait même produire un effet négatif sur le processus de biodégradation des contaminants cibles. En fait, le rôle des agents tensioactifs dans le processus de biodégradation des contaminants n'est pas toujours bien compris, même si des résultats ont montré que la production de surfactants biologiques était souvent associée à la biodégradation des composés hydrophobes tels que les hydrocarbures. Le but du présent chapitre est donc de vérifier l'effet de la présence d'un agent tensioactif chimique ou d'un surfactant biologique sur le processus de biodégradation des HAP dans un sol contaminé depuis longtemps (résidus âgés de HAP), la plupart des études réalisées dans le domaine utilisant des composés fraîchement ajoutés. Les concentrations en surfactants ont été déterminées en tenant compte des résultats obtenus dans la littérature (Jain et al. 1992; Aronstein et al. 1991; Aronstein et Alexander 1992; 1993) qui montrent le potentiel des agents tensioactifs (dont les surfactants biologiques produits par la souche *P. aeruginosa* UG2) utilisés à de faibles concentrations (10 et 100  $\mu\text{g/g}$ ) à promouvoir la biodégradation d'hydrocarbures dans les sols. Dans un premier temps, des expériences préliminaires ont été effectuées afin de: 1) vérifier la présence de microorganismes qui ont la capacité de dégrader les HAP dans le sol étudié; 2) vérifier la nécessité d'ajouter des nutriments pour l'amélioration du rendement de biodégradation des HAP et; 3) déterminer la fréquence d'addition des surfactants durant la période du biotraitement de 45 semaines. Due à leur valeur de solubilité relativement élevée et à leur faible masse molaire, le naphthalène (2 anneaux), l'acénaphthylène et l'acénaphthène (3 anneaux) ont été rapidement dégradés durant l'expérience de biodégradation des HAP. Ces HAP n'ont donc pas été traités dans ce chapitre.

## 7.2 Résultats

### 7.2.1 Présence de microorganismes dégradant les HAP

En premier lieu, la vérification de la présence dans le sol de microorganismes capables de dégrader les composés cibles est une étape importante à effectuer avant d'entreprendre le biotraitement d'un sol contaminé. En effet, il arrive que le sol ne possède pas les microorganismes nécessaires à la destruction des contaminants visés ou les conditions permettant l'action de ces microorganismes (ex: présence de métaux lourds). Cette étape a été vérifiée par l'ajout dans le sol de HAP témoins marqués au carbone-14 (figure 7.1). Rappelons que seulement des HAP radiomarqués (100 000 dpm/microcosme) ont été ajoutés. La minéralisation des HAP a alors été suivie par la production de  $^{14}\text{CO}_2$  (voir section 3.6). Notons que cette méthode est très utile pour définir l'applicabilité réelle d'un procédé de biorestauration. Cependant, les taux obtenus ne sont pas extrapolables car l'effet du temps n'est pas tenu en compte.

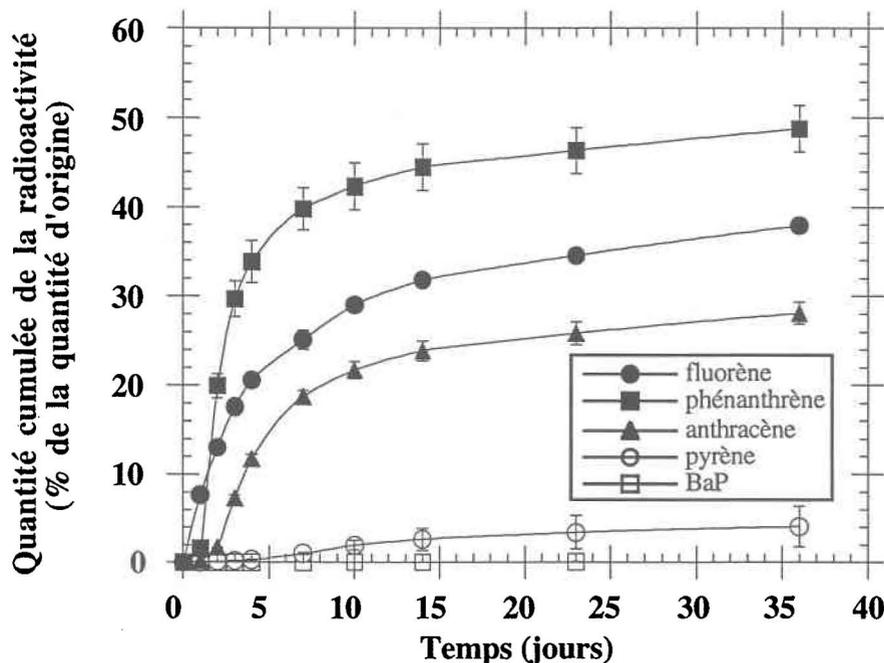


Figure 7.1: Minéralisation des [ $^{14}\text{C}$ ]HAP dans le sol contaminé à la créosote. Les barres d'erreur représentent une unité de déviation standard d'une moyenne de trois répétitions.

Les résultats présentés à la figure 7.1 montrent les courbes de minéralisation obtenues pour les HAP suivants: fluorène, phénanthrène et anthracène (3 anneaux) et pyrène (4 anneaux). Le sol contaminé contient donc les microorganismes nécessaires à la minéralisation de ces HAP. Cependant et puisqu'aucune production de  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$  n'a été observée pour le benzo(a)pyrène (BaP) formé de 5 anneaux, les résultats suggèrent que les microorganismes du sol étudié ne possèdent pas la capacité de minéraliser ce composé. Après 10 jours d'incubation, 42% du phénanthrène ajouté a été minéralisé, comparativement à seulement 29%, 22% et 2% respectivement pour le fluorène, l'anthracène et le pyrène. Plus le nombre d'anneaux augmente, plus le HAP est dégradé lentement ce qui correspond bien avec la littérature (Herbes et Schwall 1978). Dans le cas des HAP formés de 3 anneaux, l'anthracène qui possède la plus faible valeur de solubilité (0,073 mg/l; Dzombak et Luthy 1984) comparativement à celle du fluorène (1,98 mg/l) et du phénanthrène (1,29 mg/l), est celui qui a été le plus lentement biodégradé. En général, le taux de biodégradation des HAP est proportionnel à la solubilité du HAP et inversement proportionnel à sa valeur de  $\log K_{ow}$  (Wild et Jones 1993). À partir de ces résultats, l'addition de microorganismes n'a donc pas été jugée nécessaire pour effectuer la biodégradation des HAP contenus dans le sol contaminé à la créosote.

### 7.2.2 Importance de l'addition de nutriments

Afin de vérifier l'importance de l'addition de nutriments, une analyse respirométrique a été effectuée (voir section 3.5). Brièvement, la consommation de l'oxygène par le sol a été étudiée dans trois systèmes différents soit en présence et en absence de nutriments et en présence d'un inhibiteur de l'activité biologique (azoture de sodium). Les résultats de l'analyse respirométrique du sol présentés à la figure 7.2 montrent clairement que l'ajout de nutriments (MSM) a eu pour effet d'augmenter la consommation d'oxygène du sol contaminé à la créosote. En effet et pour une période d'incubation de 5 jours, un taux de consommation d'oxygène de 146 mg/kg-j a été obtenu pour le sol contenant des nutriments, comparativement à seulement 83 mg/kg-j lorsque aucun nutriment n'a été ajouté (eau seule). La consommation d'oxygène a donc presque doublé suite à l'addition des nutriments. Ces résultats reflètent bien ceux qui ont été obtenus lors de l'analyse des ions solubles et du rapport C/N du sol (chapitre 3) et qui ont montré une déficience en éléments nutritifs dans le sol étudié. En effet, la présence de nutriments tels que l'azote et le phosphore est essentielle pour la croissance des microorganismes (Leahy et Colwell 1990). Dans les sols contaminés où les concentrations en nutriments sont souvent très faibles, l'addition de nutriments constitue un moyen d'augmenter le taux de

biodégradation des contaminants organiques tels que les hydrocarbures (Lewis et al. 1986). Afin d'optimiser les conditions favorisant la biodégradation des HAP dans le sol contaminé à la créosote, l'addition de nutriments a donc été effectuée dans toutes les expériences de biodégradation. Dans le cas du témoin abiotique contenant 0,02% d'azoture de sodium (figure 7.2), une consommation d'oxygène beaucoup moins importante de 22 mg/kg-j a été détectée. Cette consommation d'oxygène peut être due à certains processus abiotiques tels que l'oxydation chimique des composés présents dans le sol.

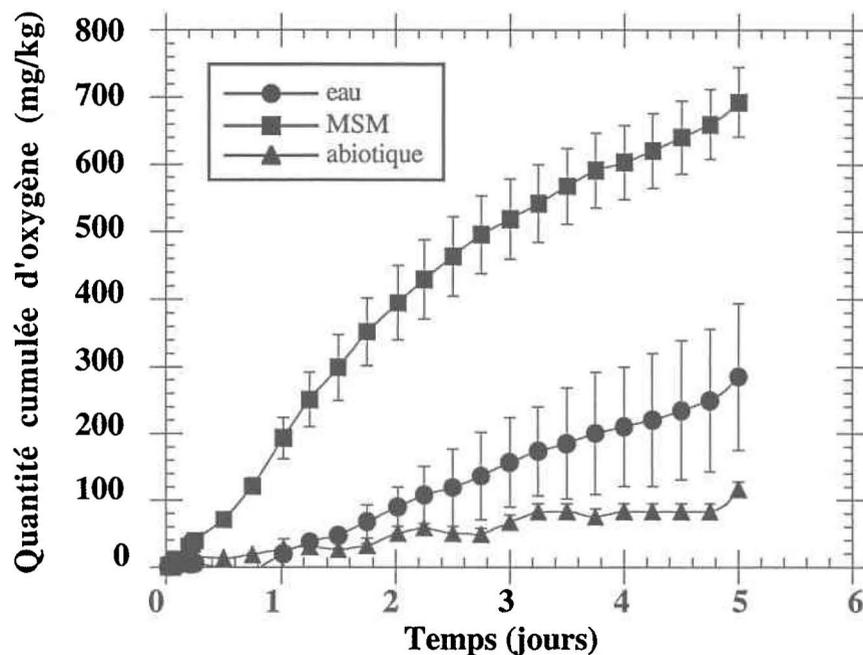


Figure 7.2: Quantité cumulée d'oxygène consommé par le sol contaminé en absence ou en présence de nutriments (MSM). Les barres d'erreur représentent une unité de déviation standard d'une moyenne de deux répétitions.

Comparativement à la consommation d'oxygène obtenue dans le sol en présence de nutriments (MSM) où l'activité microbienne est "optimisée", ces résultats suggèrent que, dans les conditions utilisées, la présence d'azoture de sodium a été efficace pour l'inhibition de l'activité métabolique microbienne. À ce sujet, notons que la présence d'azoture de sodium à la concentration de 0,02% a été efficace à l'inhibition de l'activité des microorganismes dans

d'autres expériences réalisées dans le présent travail. Par exemple, dans les expériences en microcosmes utilisant des radioisotopes, aucune production de  $^{14}\text{CO}_2$  ne fut remarquée dans les témoins abiotiques.

### 7.2.3 Détermination de la fréquence d'addition des surfactants

Afin de s'assurer que les agents tensioactifs ajoutés au sol demeurent actifs durant toute la durée du traitement, il importe de déterminer si les surfactants utilisés peuvent être dégradés par les microorganismes présents dans le sol. En effet, si les agents tensioactifs sont dégradés dans le sol au cours du temps, une fréquence d'addition des surfactants devra alors être choisie afin que l'effet de ces surfactants sur la biodégradation des HAP soit clairement vérifié. La minéralisation du  $[\alpha^{14}\text{C}]\text{SDS}$  a donc été suivie en microcosmes par la production de  $^{14}\text{CO}_2$ . Trois différentes concentrations de SDS ont été ajoutées dans le sol soit 10, 100 et 500  $\mu\text{g/g}$  (voir section 3.6). La figure 7.3 présente les résultats obtenus pour la minéralisation du SDS effectuée dans le sol contaminé à la créosote. Ces résultats montrent que le SDS, aux trois concentrations étudiées, est rapidement dégradé par la microflore indigène du sol. En effet et après 10 jours d'incubation, 45% à 60% du  $[\alpha^{14}\text{C}]\text{SDS}$  ajouté a été minéralisé. L'augmentation de la concentration en SDS a eu pour effet de diminuer son propre taux de minéralisation durant les premiers jours d'incubation. Cependant, à plus long terme, près de 65% du  $[\alpha^{14}\text{C}]\text{SDS}$  ajouté a été minéralisé, et ceci pour les trois concentrations en SDS tel que montré par les courbes de minéralisation qui tendent à se rejoindre (figure 7.3, graphique du bas).

Les voies métaboliques de dégradation du SDS par les bactéries ont déjà été présentées dans la littérature (White et Russel 1992). Pour parvenir à la minéralisation complète du SDS en  $\text{CO}_2$ , en sels inorganiques et en composantes cellulaires, la dégradation de tout intermédiaire qui contient le carbone résiduel (carbone en position  $\alpha$ ) doit être réalisée. En effet, la biodégradation du SDS par les bactéries peut mener à la formation d'intermédiaires tels que l'acide 4-sulfate butanoïque et l'acide 2-sulfate éthanoïque qui contiennent le carbone résiduel en position  $\alpha$ . La figure 7.4 présente ces deux principaux intermédiaires.

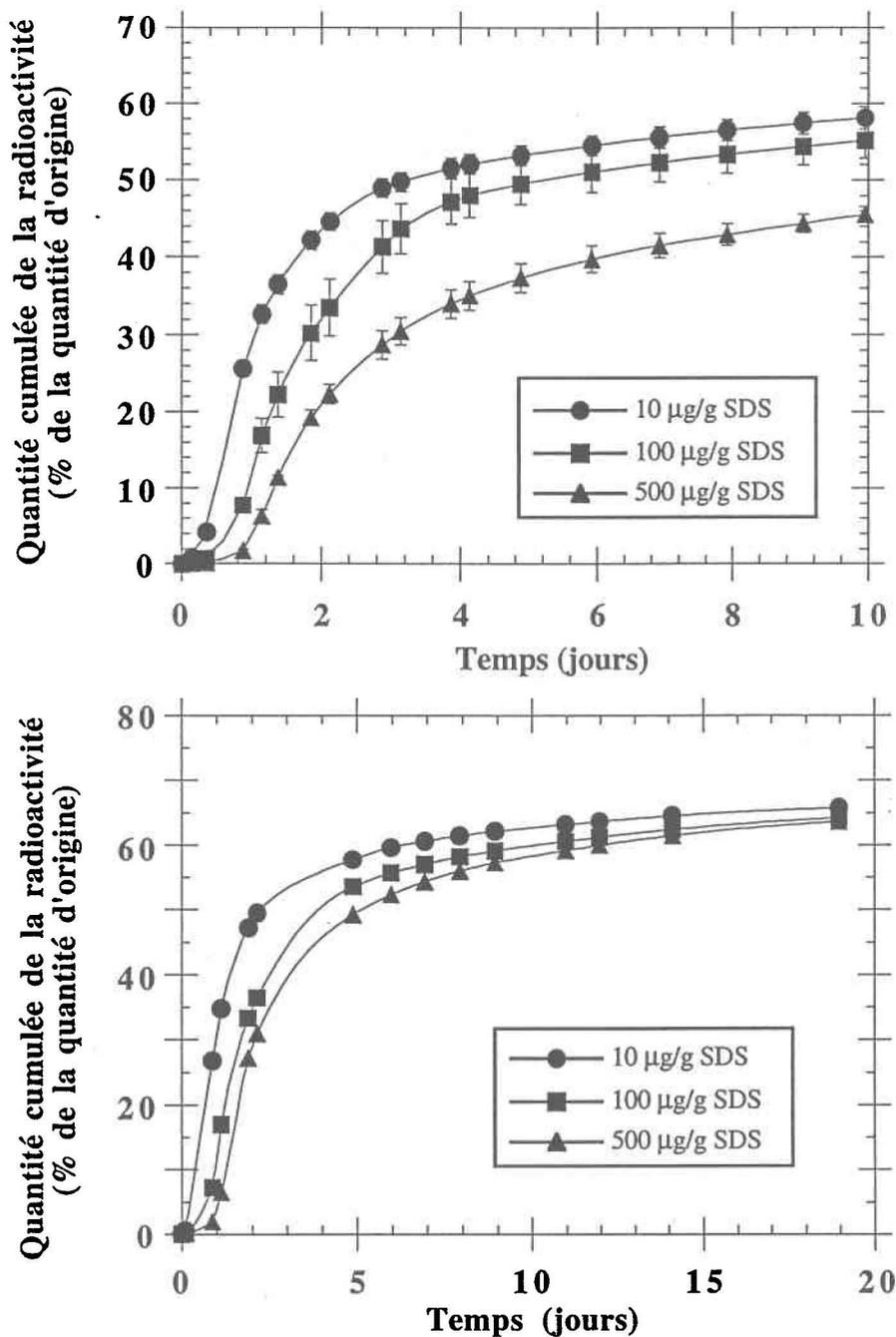


Figure 7.3: Minéralisation du  $[^{14}\text{C}]$ SDS dans le sol contaminé à la créosote. Les barres d'erreur représentent une unité de déviation standard d'une moyenne de trois répétitions.

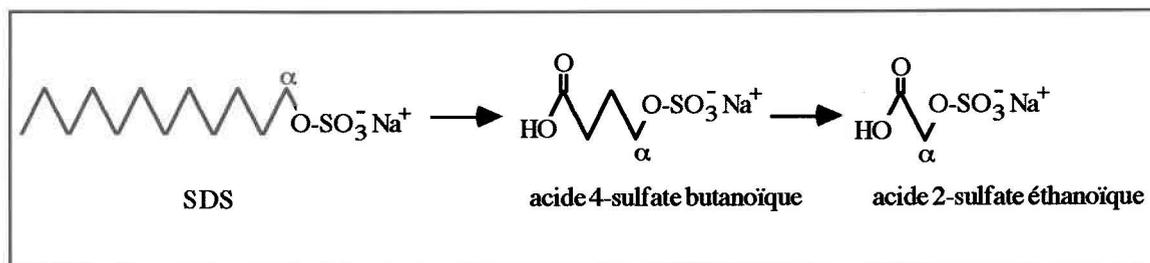


Figure 7.4: Intermédiaires organiques qui peuvent être formés durant la biodégradation du SDS (White et Russel 1992).

Puisque le SDS utilisé dans cette expérience possède un carbone marqué situé en position  $\alpha$  de la molécule ( $[\alpha^{14}\text{C}]\text{SDS}$ ), la production de  $[\text{C}^{14}]\text{CO}_2$  a donc permis de vérifier la minéralisation complète du SDS par les microorganismes du sol.

Dans le cas des surfactants biologiques étudiés, leur biodégradation en phase liquide par des microorganismes isolés d'un sol contaminé à la créosote a déjà été démontrée (Providenti 1994). De plus, des résultats obtenus durant les expérimentations réalisées dans le présent projet appuient l'hypothèse de la biodégradation rapide de ces agents tensioactifs biologiques par les microorganismes du sol utilisé. Par exemple, on a déjà noté la diminution rapide dans le milieu de culture de la concentration des agents tensioactifs biologiques produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 (figure 4.1), lorsque le glucose utilisé comme substrat a été complètement dégradé. Ceci suggère que les surfactants biologiques ont été biodégradés par la souche bactérienne lorsque la source initiale de substrat n'était plus disponible. Finalement, une perte des propriétés tensioactives du SDS et des surfactants biologiques, en présence des microorganismes du sol contaminé et en système sol/eau, a été montrée par la mesure de la tension de surface et par diverses observations qualitatives (tableaux 4.1 et 4.2). En regard des résultats obtenus et afin d'assurer que: 1) les agents tensioactifs étudiés puissent agir durant toute la période de biodégradation des HAP (45 semaines), et que: 2) les surfactants ne s'accumulent pas dans le sol suite à leur addition répétée, une fréquence d'addition de surfactants de deux semaines a alors été choisie.

### 7.2.4 Homogénéité du sol de départ

Pour l'expérience de biodégradation des HAP en présence des agents tensioactifs étudiés, l'homogénéité du sol entre les différents échantillons de départ (microcosmes) est très importante à considérer afin de comparer ces derniers entre eux. En effet, l'étude d'un sol ne permet pas une homogénéisation du système de départ aussi évidente que dans le cas d'un système en phase liquide. À ce sujet, la caractérisation des 24 échantillons de sol dans les microcosmes au jour 0 de l'expérience de biodégradation apporte d'importantes informations. Le tableau 7.1 montre les déviations standards relatives obtenues pour chacun des 13 HAP prioritaires étudiés. Pour les HAP formés de 3 et 4 anneaux et qui sont les plus biodégradables, des déviations standards relatives de 8% et moins ont été obtenues. Ces valeurs sont très acceptables si on considère que ces variations sont attribuables à la fois à l'hétérogénéité du sol entre les 24 échantillons et à la reproductibilité de la méthode d'extraction en tubes. Le sol utilisé au départ de l'essai de biodégradation des HAP peut donc être considéré comme étant homogène entre les différents microcosmes pour ces HAP.

Tableau 7.1: Déviations standards relatives obtenues pour les concentrations de HAP dans les 24 échantillons de sol de départ

HAP	Dév. std (%)
fluorène	5
phénanthrène	5
anthracène	8
fluoranthène	5
pyrène	4
benzo(a)anthracène	3
chrysène	4
benzo(b)fluoranthène	12
benzo(k)fluoranthène	26
benzo(a)pyrène	12
dibenzo(a,h)anthracène	9
indéno(1,2,3-cd)pyrène	16
benzo(g,h,i)pérylène	14

Dans le cas des HAP formés de 5 et 6 anneaux, des déviations standards relatives plus importantes ont été obtenues. Ceci peut s'expliquer par les concentrations plus faibles de ces HAP dans le sol.

### **7.2.5 Effet des surfactants sur la biodégradation des HAP contenus dans le sol contaminé à la créosote**

Cette section présente les résultats de la biodégradation des HAP dans le sol en présence et en absence de l'un ou l'autre des deux agents tensioactifs étudiés. Rappelons que chacun des deux surfactants utilisés a été ajouté aux concentrations de 10, 100 et 500  $\mu\text{g/g}$  et ce, à une fréquence d'addition de 2 semaines. Y compris le traitement sans addition de surfactants, 7 différents traitements ont donc été effectués. Périodiquement, des échantillons de sol ont été prélevés dans chacun des 24 microcosmes et les concentrations résiduelles en HAP ont été déterminées (voir section 3.8). Notons également qu'une augmentation importante du nombre de microorganismes s'est produite durant l'expérience de biodégradation. En effet, le nombre d'hétérotrophes totaux est passé d'approximativement  $5,6 \times 10^5$  UFC/g sol sec (chapitre 3) à  $1,1 \times 10^8$  UFC/g sec en moyenne (sans surfactants, avec 500  $\mu\text{g/g}$  de SDS et avec 500  $\mu\text{g/g}$  de surfactants biologiques) après les 45 semaines de traitement.

#### **7.2.5.1 HAP formés de 3 anneaux**

La figure 7.5 présente les courbes de biodégradation obtenues pour trois HAP formés de 3 anneaux. Les résultats montrent qu'aucune concentration résiduelle de fluorène et de phénanthrène n'a été détectée dans le sol contaminé après 11 semaines d'incubation (figure 7.5) et ceci pour tous les traitements. Pour l'anthracène, la biodégradation obtenue en 11 semaines a été de 80 % et est demeurée presque constante durant la période de traitement de 45 semaines. En effet, le pourcentage de biodégradation obtenu après 45 semaines a été de 85%. Le fluorène et le phénanthrène ont été biodégradés plus rapidement que l'anthracène. Ceci peut être expliqué par la solubilité de l'anthracène (0,073 mg/l) qui est nettement inférieure à celles du fluorène et du phénanthrène (respectivement 1,98 et 1,29 mg/l) (Dzombak et Luthy 1984). Pour ce qui est de la biodégradation plus rapide du phénanthrène par rapport à celle du fluorène, cette dernière peut s'expliquer par la différence entre les structures des deux molécules. En effet, par sa structure angulaire, le phénanthrène possède une région appelée "the bay region". Cette région favorise l'attaque des enzymes sur le phénanthrène (Gibson et Subramanian 1984). Notons que des résultats semblables (taux de biodégradation du phénanthrène > taux de biodégradation du fluorène > taux de biodégradation de l'anthracène) ont été obtenus durant la biodégradation des HAP radiomarqués (figure 7.1).

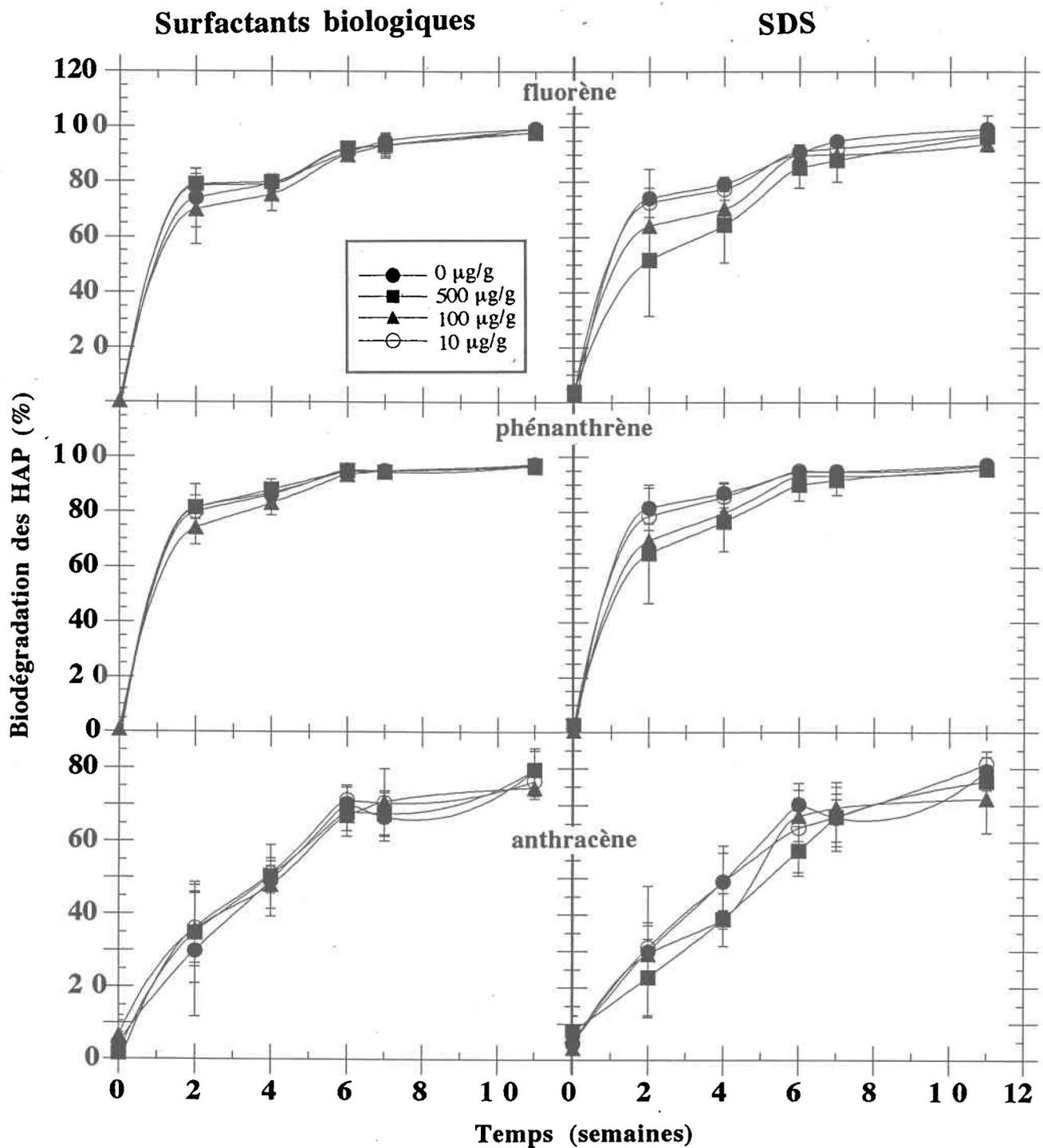


Figure 7.5: Biodégradation des HAP formés de 3 anneaux dans le sol contaminé à la créosote en absence et en présence de différentes concentrations des deux surfactants étudiés. Les données sont exprimées en pourcentage du témoin abiotique. Les barres d'erreur représentent une unité de déviation standard d'une moyenne de trois répétitions.

La biodégradation, à 11 semaines de traitement, des HAP formés de 3 anneaux n'a pas été significativement affectée par la présence de l'une ou de l'autre des trois concentrations de surfactants biologiques (tableau 7.2). En effet et suite à l'application de l'analyse de covariance, des valeurs de P supérieures à 0,1 ont été obtenues. Toutefois, la présence de SDS aux concentrations de 100  $\mu\text{g/g}$  et de 500  $\mu\text{g/g}$  a significativement diminué la biodégradation du fluorène et du phénanthrène dans le sol contaminé (figure 7.5 et tableau 7.2), pour un niveau de confiance de 95%. Par exemple et après 4 semaines de traitement, la concentration résiduelle moyenne de fluorène était de 57 mg/kg pour le sol non traité (sans SDS) comparativement à 98, 82 et 62 mg/kg pour les sols traités avec respectivement 500, 100 et 10  $\mu\text{g/g}$  de SDS. Après la même période de temps, 116 mg/kg de phénanthrène ont été retrouvés dans le sol sans SDS, alors que les sols traités avec les mêmes concentrations de SDS énoncées ci-haut en contenaient 209, 180 et 128 mg/kg. Pour l'anthracène et après 11 semaines de traitement, les résultats de l'analyse de covariance ne montrent pas de différences significatives entre les traitements pour un niveau de confiance de 95%.

Tableau 7.2: Valeurs de P observées pour la comparaison entre les traitements en présence de surfactants et celui effectué en absence de surfactants (HAP formés de 3 anneaux, 11 semaines de traitement)

HAP	Traitements					
	Surfactants biologiques ( $\mu\text{g/g}$ )			SDS ( $\mu\text{g/g}$ )		
	10	100	500	10	100	500
fluorène	0,8389	0,1782	0,5048	0,2306	0,0030 **	0,0023 **
phénanthrène	0,7809	0,2619	0,9299	0,8017	0,0464 **	0,0137 **
anthracène	0,7851	0,9491	0,7504	0,9448	0,2533	0,0950 *

\* Valeurs significativement différentes à un seuil de 10%

\*\* Valeurs significativement différentes à un seuil de 5%

Les tableaux 7.3 et 7.4 présentent les taux de biodégradation en % de biodégradation/semaine obtenus pour une relation linéaire et pour deux périodes de temps différentes. Ces deux périodes de temps ont été choisies en fonction des courbes obtenues à la figure 7.5 qui semblent présenter 2 droites de pentes différentes. Ceci est d'autant plus réaliste pour les HAP formés de 4 anneaux (voir plus bas). Pour les HAP formés de 3 anneaux, des taux élevés de

biodégradation ont été obtenus au tout début du traitement, soit durant les deux premières semaines (tableau 7.3).

Tableau 7.3: Taux de biodégradation des HAP formés de 3 anneaux obtenus pour une relation linéaire pour chacun des traitements pour la période de 0 à 2 semaines.

Traitements	Taux de biodégradation (%/semaine)		
	Fluorène R <sup>(b)</sup> =0,99	Phénanthrène R=0,99	Anthracène (0 à 6 semaines) R>0,98
sans surfactants	38,9	42,3	10,8
500 µg/g surf <sup>(a)</sup> . biol.	40,9	43,0	10,7
100 µg/g surf. biol.	34,7	36,7	9,7
10 µg/g surf. biol.	40,4	42,7	11,8
500 µg/g SDS	23,9	31,1	8,2
100 µg/g SDS	30,4	34,5	10,1
10 µg/g SDS	34,3	38,0	9,8

(a) surf. =surfactant, (b) R= coefficient de corrélation

Par exemple, pour le fluorène, un taux de biodégradation de près de 39%/semaine est obtenu pour le traitement dans lequel aucun surfactant n'a été ajouté. Comparativement aux deux autres HAP, l'anthracène présente des taux de biodégradation beaucoup plus faibles. En effet, pour le traitement sans surfactant, un taux de près de 11 % est obtenu. La diminution du taux de biodégradation des HAP par une augmentation de la concentration du SDS est également observée.

Tableau 7.4: Taux de biodégradation des HAP formés de 3 anneaux obtenus pour une relation linéaire pour chacun des traitements pour la période de 2 à 7 semaines.

Traitements	Taux de biodégradation (%/semaine)		
	Fluorène R <sup>(b)</sup> >0,97	Phénanthrène R>0,97	Anthracène (7 à 11 semaines) R=1
sans surfactants	4,3	2,8	3,2
500 µg/g surf <sup>(a)</sup> . biol.	3,2	2,8	3,0
100 µg/g surf. biol.	5,0	4,3	1,0
10 µg/g surf. biol.	3,4 <sup>(c)</sup>	3,3	1,5
500 µg/g SDS	7,7	5,6	2,4
100 µg/g SDS	5,8	5,1	0,6
10 µg/g SDS	4,4	3,5	3,6

(a) surf. =surfactant, (b) R= coefficient de corrélation, (c) R=0,93

#### 7.2.5.2 HAP formés de 4 anneaux

La figure 7.6 présente les courbes de biodégradation obtenues pour les quatre HAP formés de 4 anneaux. Les résultats montrent que la biodégradation de ces derniers a été beaucoup plus lente que celle observée pour les HAP formés de 3 anneaux (fluorène, phénanthrène et anthracène). Ceci est en accord avec les résultats de Park et al. (1990) qui ont montré que la biodégradation des HAP suivait l'ordre suivant: 2 anneaux > 3 anneaux > 4 anneaux. En général, plus le nombre d'anneaux est élevé, plus le contaminant est récalcitrant (Herbes et Schwall 1978).

Ceci peut également être attribué aux différences de solubilité entre les deux groupes de HAP. En général, les valeurs de solubilité diminuent de façon logarithmique à mesure que le nombre d'anneaux augmente. En absence d'agents tensioactifs, la presque totalité des HAP formés de 4 anneaux a été dégradée par voie biologique en 45 semaines de traitement (figure 7.6). En effet, près de 95% du fluoranthène et du pyrène retrouvés dans le sol a été biodégradé. Une valeur de 90% a été obtenue pour le benzo(a)anthracène. Le chrysène, présentant la solubilité la plus faible de ce groupe (0,002 mg/l comparativement à 0,26, 0,135 et 0,014 mg/l, respectivement

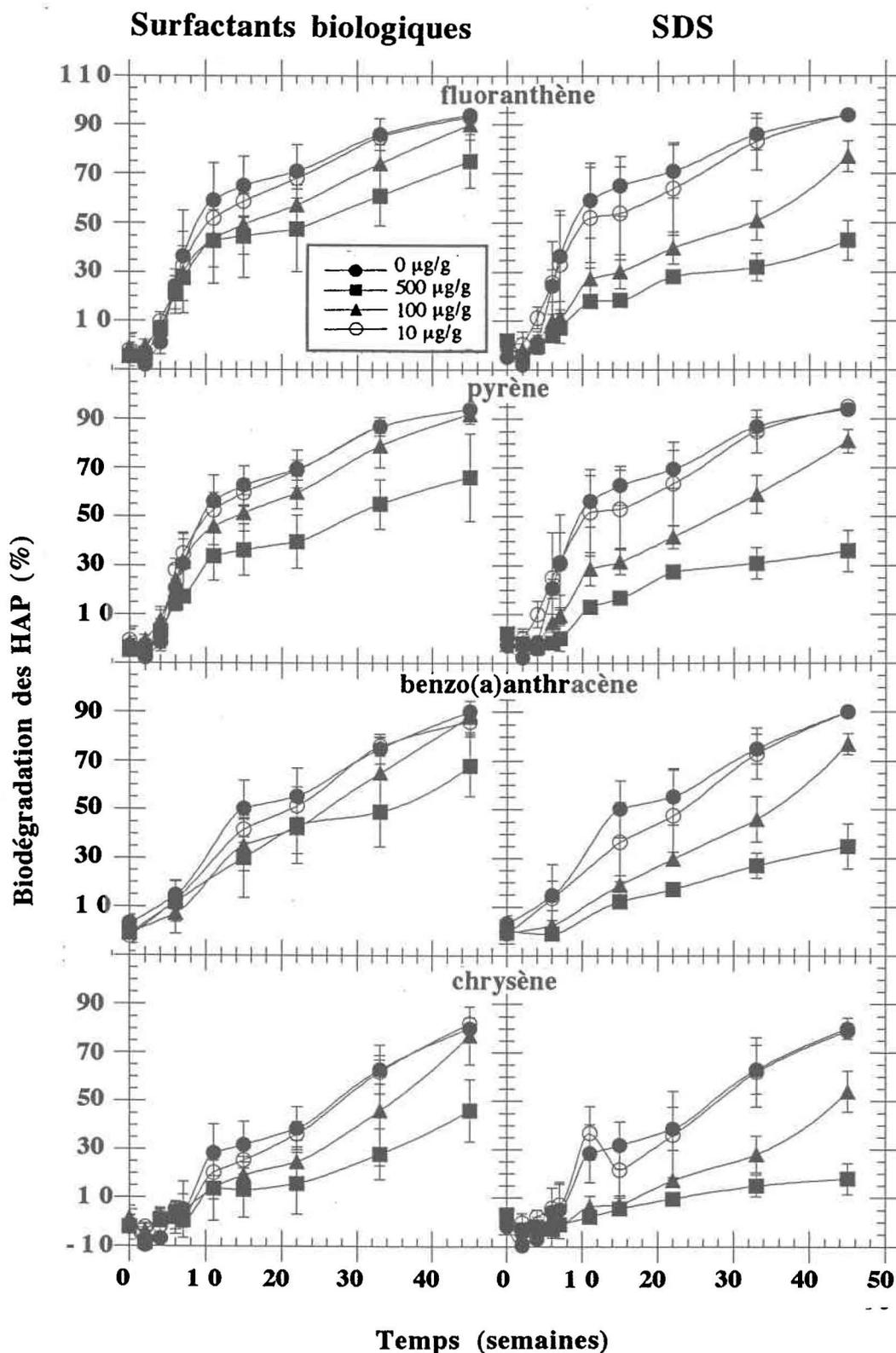


Figure 7.6: Biodégradation des HAP formés de 4 anneaux dans le sol contaminé à la créosote en absence et en présence de différentes concentrations des deux surfactants étudiés. Les données sont exprimées en pourcentage du témoin abiotique. Les barres d'erreur représentent une unité de déviation standard d'une moyenne de trois répétitions.

pour le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)anthracène (Dzombak et Luthy 1984)), est celui qui a montré le plus faible rendement de biodégradation (80% en 45 semaines).

Contrairement aux résultats obtenus pour la biodégradation des 3 anneaux (figure 7.5), une phase d'adaptation est observée durant la biodégradation des HAP formés de 4 anneaux. En effet, aucune dégradation importante de ces HAP n'a été observée durant les deux à quatre premières semaines d'incubation. Cette phase de latence peut être expliquée par la présence, au début du traitement, d'autres substrats plus aisément biodégradables tels que les HAP formés de 2 et 3 anneaux. Par exemple, d'autres auteurs (Bossert et Bartha 1986) expliquent la lente biodégradation du pyrène contenu dans des boues huileuses par le fait que celui-ci se retrouve fréquemment en présence de substrats plus biodégradables, plutôt que par la très faible biodégradabilité du composé. Les valeurs négatives de pourcentage de biodégradation retrouvées à la figure 7.6 dans les premiers jours d'incubation s'expliquent par des concentrations en HAP plus élevées dans les traitements que dans les témoins abiotiques.

Les résultats de l'analyse de covariance (tableau 7.5) montrent que l'addition de 10  $\mu\text{g/g}$  de l'un ou de l'autre des deux agents tensioactifs étudiés n'a pas affecté de façon significative la biodégradation des HAP formés de 4 anneaux. Cependant, l'addition de 100  $\mu\text{g/g}$  et de 500  $\mu\text{g/g}$  de surfactants biologiques a produit un effet négatif hautement significatif ( $P < 0,01$ ) sur la biodégradation de ces HAP, l'effet étant plus important pour une concentration en surfactants de 500  $\mu\text{g/g}$ . Similairement, la présence de SDS à ces deux concentrations a eu pour effet de diminuer significativement ( $P < 0,01$ ) la biodégradation de ces HAP.

Tableau 7.5: Valeurs de P observées pour la comparaison entre les traitements en présence de surfactants et celui effectué en absence de surfactants (HAP formés de 4 anneaux, 45 semaines de traitement)

HAP	Traitements					
	Surfactants biologiques ( $\mu\text{g/g}$ )			SDS ( $\mu\text{g/g}$ )		
	10	100	500	10	100	500
fluoranthène	0,2635	0,0001 ***	0,0001 ***	0,4671	0,0001 ***	0,0001 ***
pyrène	0,8928	0,0006 ***	0,0001 ***	0,8582	0,0001 ***	0,0001 ***
benzo(a)anthracène	0,1353	0,0003 ***	0,0001 ***	0,2213	0,0001 ***	0,0001 ***
chrysène	0,7599	0,0003 ***	0,0001 ***	0,6894	0,0001 ***	0,0001 ***

\*\*\* Valeurs significativement différentes à un seuil de 1%

En comparaison avec l'effet des surfactants de *P. aeruginosa* UG2, l'effet négatif du SDS a cependant été davantage marqué. Par exemple et après 45 semaines de traitement, seulement 36% du pyrène a été biodégradé en présence 500  $\mu\text{g/g}$  de SDS, comparativement à 66% en présence de la même concentration de surfactants biologiques. Enfin et comparativement aux résultats obtenus avec les HAP formés de 3 anneaux, les résultats montrent de plus que l'effet des surfactants a été plus important dans le cas des HAP formés de 4 anneaux.

Les tableaux 7.6 et 7.7 présentent les taux de biodégradation (% de biodégradation/semaine) des HAP formés de 4 anneaux obtenus pour une relation linéaire et pour deux périodes de temps différentes. Les résultats montrés plus haut sont observés également ici. En résumé, les taux de biodégradation les plus élevés sont observés pour le traitement dans lequel aucun surfactant n'a été ajouté. En comparaison avec le benzo(a)anthracène et le chrysène, des taux de biodégradation plus élevés ont été obtenus pour le fluoranthène et le pyrène. Enfin, plus la concentration des surfactants est élevée, plus le taux de biodégradation est bas, le SDS ayant un effet négatif plus important que celui produit par la présence des surfactants biologiques.

Tableau 7.6: Taux de biodégradation des HAP formés de 4 anneaux obtenus pour une relation linéaire pour chacun des traitements pour la période de 2 à 11 semaines.

Traitements	Taux de biodégradation (%/semaine)			
	Fluoranthène R=0,99	Pyrène R>0,97	Benzo(a)anthracène (0 à 15 semaines) R>0,97	Chrysène R>0,94
sans surfactants	7,87	7,51	3,20	4,33
500 µg/g surf. biol.	5,36	4,36	2,07	2,19
100 µg/g surf. biol.	5,09	5,39	2,44	1,87
10 µg/g surf. biol.	6,18	6,55	2,95	2,57
500 µg/g SDS	2,53	1,75 <sup>(a)</sup>	0,84 <sup>(b)</sup>	0,55 <sup>(c)</sup>
100 µg/g SDS	3,28	3,53	1,34	1,20
10 µg/g SDS	5,85	5,87	2,52	4,09 <sup>(d)</sup>

(a) R=0,88, (b) R=0,87, (c) R=0,90, (d) R=0,92

Tableau 7.7: Taux de biodégradation des HAP formés de 4 anneaux obtenus pour une relation linéaire pour chacun des traitements pour la période de 11 à 45 semaines.

Traitements	Taux de biodégradation (%/semaine)			
	Fluoranthène R>0,98	Pyrène R>0,98	Benzo(a)anthracène (15 à 45 semaines) R>0,98	Chrysène R>0,96
sans surfactants	1,04	1,14	1,39	1,59
500 µg/g surf. biol.	0,97	0,98	1,17	0,97
100 µg/g surf. biol.	1,37	1,39	1,81	1,83
10 µg/g surf. biol.	1,24	1,25	1,54	1,87
500 µg/g SDS	0,74	0,66 <sup>(a)</sup>	0,78	0,46
100 µg/g SDS	1,43	1,56	1,90	1,39
10 µg/g SDS	1,32	1,38	1,83	1,55 <sup>(b)</sup>

(a) R=0,95, (b) R=0,93

La figure 7.7 présente les concentrations résiduelles mesurées pour chacun des HAP formés de 4 anneaux au début et après 45 semaines de traitement. Les effets produits par chacun des deux agents tensioactifs aux trois concentrations étudiées y sont clairement montrés. En effet, c'est à l'intérieur du traitement sans surfactant, et à l'intérieur de ceux effectués en présence de la plus faible concentration d'agents tensioactifs (10  $\mu\text{g/g}$ ) que la biodégradation s'est avérée être la plus efficace.

Une attention particulière doit être portée sur les concentrations résiduelles retrouvées dans les témoins abiotiques de la figure 7.7. En effet, cette dernière montre de plus qu'après 45 semaines de traitement, aucune perte abiotique importante des HAP étudiés n'a été observée. Par exemple, une concentration résiduelle de 760 mg/kg a été obtenue à la semaine 45 pour le fluoranthène, ce qui se compare bien à la concentration initiale de 788 mg/kg déterminée en début du traitement (figure 7.7). De telles concentrations dans les témoins abiotiques montrent également l'homogénéité du sol et la reproductibilité des manipulations et des méthodes expérimentales employées durant les 45 semaines de traitement.

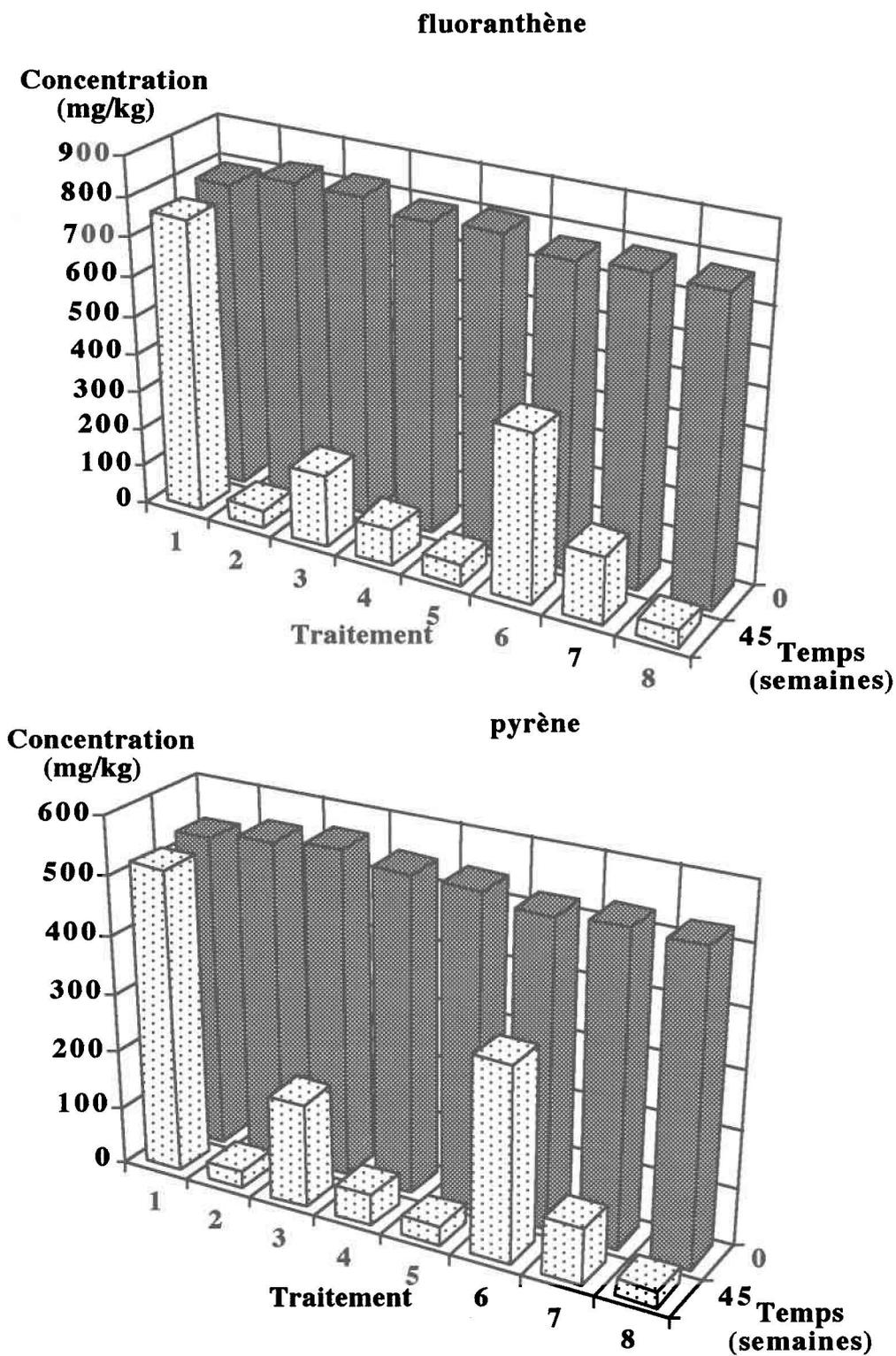


Figure 7.7: Concentrations résiduelles (45 semaines) des HAP formés de 4 anneaux dans le sol contaminé à la créosote en présence de (1) 0,02%  $\text{NaN}_3$ , (2) MSM seul, (3) 500, (4) 100 et (5) 10  $\mu\text{g/g}$  surfactants biologiques + MSM, (6) 500, (7) 100 et (8) 10  $\mu\text{g/g}$  SDS + MSM.

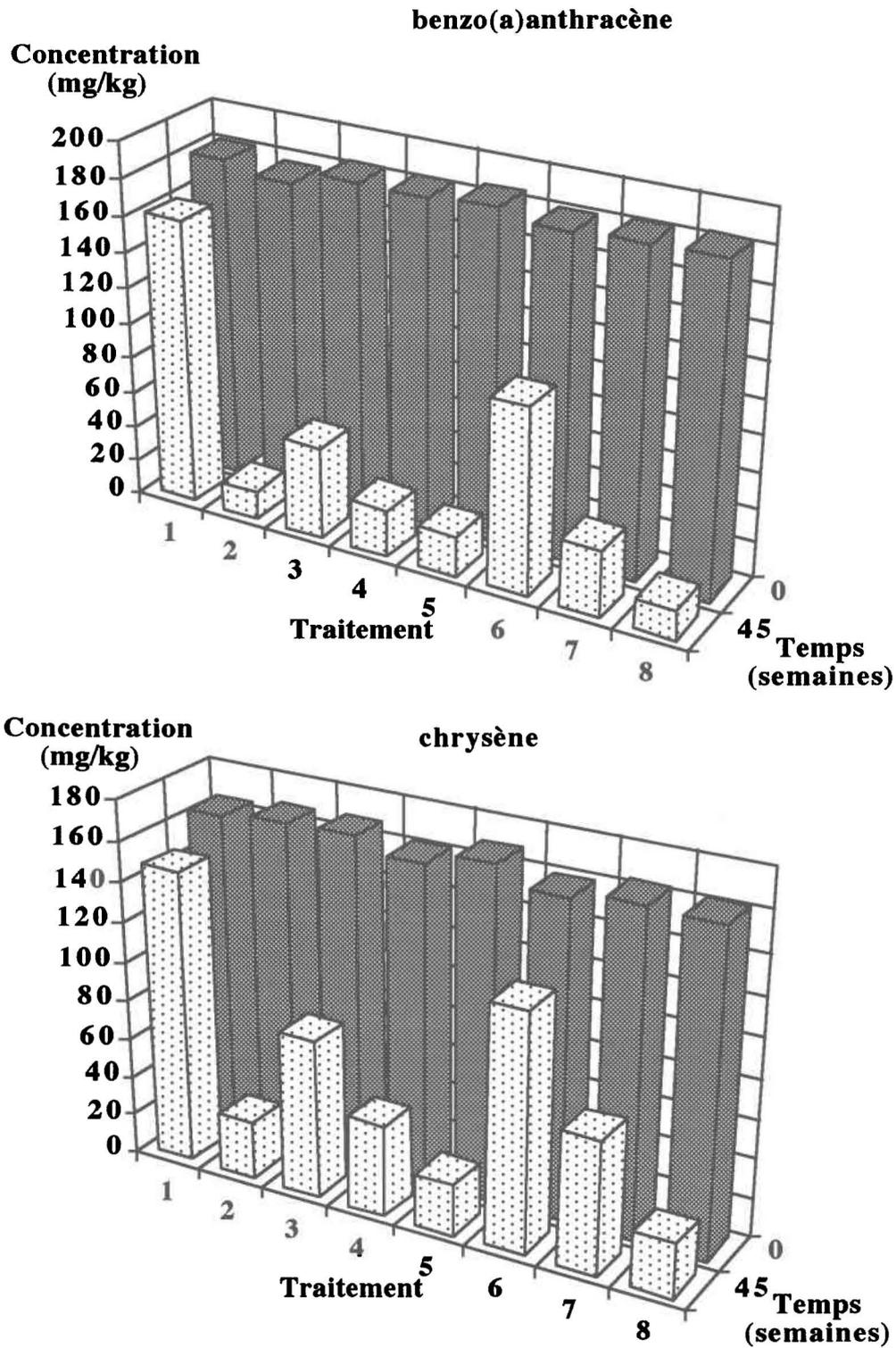


Figure 7.7: Concentrations résiduelles (45 semaines) des HAP formés de 4 anneaux dans le sol contaminé à la créosote en présence de (1) 0,02%  $\text{NaN}_3$ , (2) MSM seul, (3) 500, (4) 100 et (5) 10  $\mu\text{g/g}$  surfactants biologiques + MSM, (6) 500, (7) 100 et (8) 10  $\mu\text{g/g}$  SDS + MSM.

### 7.2.5.3 HAP formés de 5 et 6 anneaux

Les HAP formés de 5 anneaux et plus n'ont pas été biodégradés après 45 semaines de traitement. La présence des surfactants n'a pas aidé à la biodégradation de ces HAP lourds et très hydrophobes. La figure 7.8 présente, pour exemple, les résultats obtenus pour le benzo(a)pyrène, l'un des HAP de masse molaire élevée les plus étudiés dans la littérature. Les résultats montrent également de très faibles pertes abiotiques et ceci même après 45 semaines de traitement. Une variation analytique normale de concentration est observée entre les échantillons.

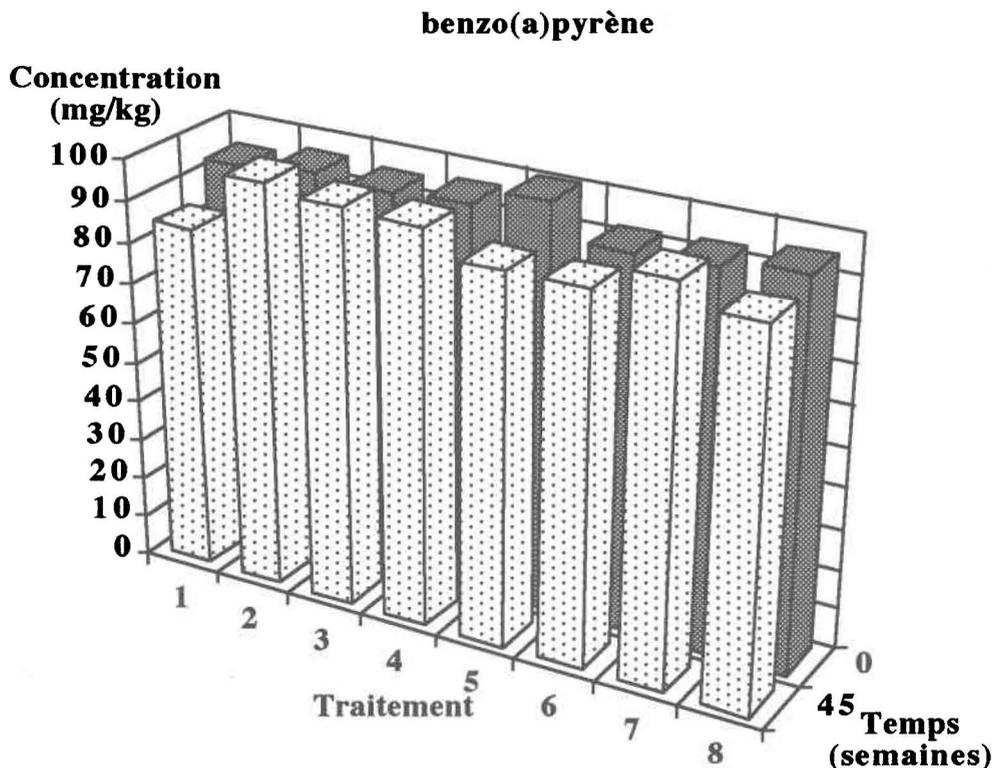


Figure 7.8: Concentrations résiduelles (45 semaines) de benzo(a)pyrène dans le sol contaminé à la créosote en présence de (1) 0,02%  $\text{NaN}_3$ , (2) MSM seul, (3) 500, (4) 100 et (5) 10  $\mu\text{g/g}$  surfactants biologiques, (6) 500, (7) 100 et (8) 10  $\mu\text{g/g}$  SDS.

Des résultats similaires, indiqués au tableau 7.8, ont été obtenus pour les HAP suivants: benzo(b)- et benzo(k)fluoranthène, dibenzo(a,h)anthracène, indéno(1,2,3-cd)pyrène, et benzo(g,h,i)pérylène. Pour ces HAP, des valeurs de biodégradation voisines de 0% ont été obtenues. Les valeurs négatives pour le pourcentage d'enlèvement des HAP sont attribuables au fait que la concentration des HAP dans le témoin abiotique était plus basse que celle obtenue dans l'échantillon non stérilisé. Les grandes variations obtenues pour le pourcentage d'enlèvement peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité du sol de départ pour ces HAP formés de 5 et de 6 anneaux (tableau 7.1). Notons finalement que la très faible biodégradabilité des HAP formés de plus de 4 anneaux avait déjà été observée dans d'autres études (Aprill et Sims 1990).

Tableau 7.8: Pourcentage<sup>(a)</sup> d'enlèvement des HAP formés de 5 anneaux ou plus par dégradation biologique

HAP	TRAITEMENTS						
	MSM	Surfactants biologiques ( $\mu\text{g/g}$ )			SDS ( $\mu\text{g/g}$ )		
		10	100	500	10	100	500
benzo(b)fluoranthène	2	13	14	4	2	5	5
benzo(k)fluoranthène	-1	-14	2	12	-6	12	4
benzo(a)pyrène	-20	-7	-14	-15	-8	-14	-7
dibenzo(a,h)anthracène	0	10	0	-29	5	-4	-6
indéno(1,2,3-cd)pyrène	-5	-4	-10	-13	-4	-8	-7
benzo(g,h,i)pérylène	-18	-13	-10	-22	-1	-10	17

(a) Les valeurs sont exprimées en pourcentage du témoin abiotique

### 7.2.6 Effet du SDS sur la biodégradation du [<sup>14</sup>C]phénanthrène

La minéralisation du phénanthrène marqué au carbone-14 (100 000 dpm) en présence de SDS a été étudiée afin de: 1) vérifier l'effet d'un seul ajout des trois concentrations étudiées de SDS (10, 100 et 500  $\mu\text{g/g}$  SDS) sur la minéralisation de ce HAP modèle et: 2) comme cette expérience a été réalisée en même temps que la minéralisation du SDS par la microflore indigène

du sol (figure 7.3), de vérifier si les microorganismes peuvent biodégrader le phénanthrène avant que le SDS ne soit complètement minéralisé (voir section 3.6). La figure 7.9 montre les résultats de la minéralisation du [ $^{14}\text{C}$ ]phénanthrène en présence des différentes concentrations de SDS. Avec un seul ajout de SDS, des résultats similaires à ceux qui ont été obtenus avec les HAP d'origine adsorbés dans le sol contaminé à la créosote ont été obtenus. En effet, la minéralisation du [ $^{14}\text{C}$ ]phénanthrène par la microflore indigène a été diminuée par la présence de 100  $\mu\text{g/g}$  et de 500  $\mu\text{g/g}$  SDS.

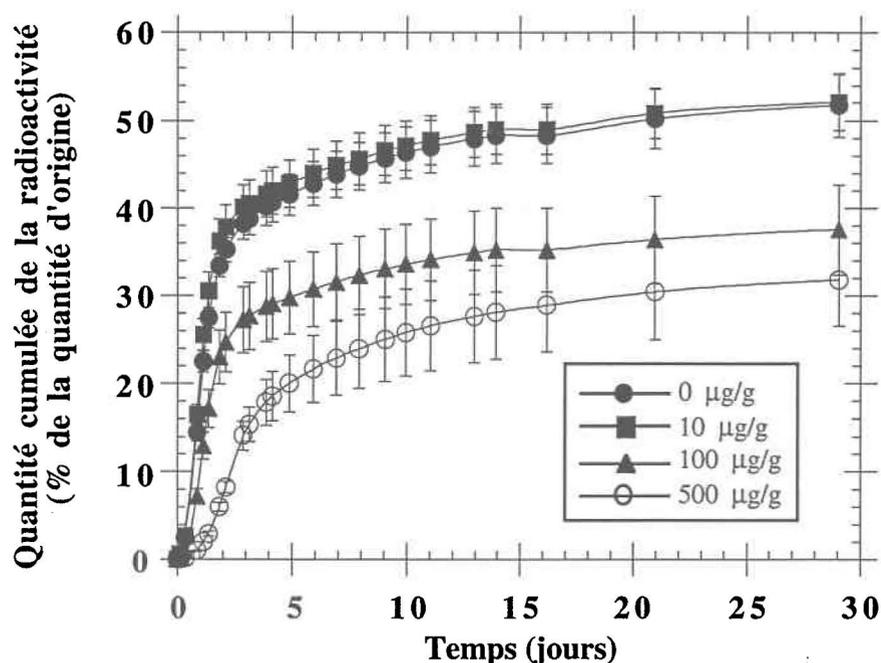


Figure 7.9: Effet du SDS sur la biodégradation du [ $^{14}\text{C}$ ]phénanthrène dans le sol contaminé à la créosote. Les barres d'erreur représentent une unité de déviation standard d'une moyenne de trois répétitions.

Par exemple et en présence de 500  $\mu\text{g/g}$  de SDS, seulement 20% du phénanthrène ajouté a été minéralisé en 5 jours, comparativement à environ 40% en absence du surfactant. Durant la même période, 30% du phénanthrène ajouté a été minéralisé en présence de 100  $\mu\text{g/g}$  de SDS. Notons qu'à une concentration en SDS de 500  $\mu\text{g/g}$ , une phase de latence est observée pour la

biodégradation du phénanthrène. À l'opposé, la présence de 10  $\mu\text{g/g}$  de SDS n'a pas affecté de façon importante la minéralisation du phénanthrène.

Pour les concentrations en SDS de 100 et de 500  $\mu\text{g/g}$ , l'effet du SDS sur la minéralisation du phénanthrène a donc été d'en ralentir le taux de biodégradation. Comme à ces concentrations, le SDS a cependant été minéralisé en moins de 5 jours tel que déduit de la figure 7.3, la diminution du pourcentage cumulatif maximal de minéralisation du phénanthrène (aux concentrations en SDS de 100 et 500  $\mu\text{g/g}$ ) après cette période de temps ne serait donc pas attribuable à la présence du SDS. En fait, cette diminution du pourcentage cumulatif maximal est fréquemment observé dans les expériences impliquant l'ajout de radioisotopes. Plus un composé est lent à biodégrader au tout début de l'expérience, plus le pourcentage cumulatif maximal atteint une valeur faible. Ceci peut s'expliquer par la diminution de la biodisponibilité du composé fraîchement ajouté en fonction du temps. Un composé rapidement biodégradé pourra alors atteindre un pourcentage cumulatif maximal plus élevé qu'un composé plus récalcitrant qui a plus de temps pour s'adsorber sur les particules de sol. Comme en présence de 100 et 500  $\mu\text{g/g}$  de SDS le phénanthrène a été biodégradé plus lentement, la fraction de phénanthrène restante serait donc devenue moins biodisponible avec le temps.

Enfin, la minéralisation du phénanthrène en présence des trois concentrations en SDS s'est produite même si le SDS ajouté n'était pas complètement biodégradé tel que déduit à la figure 7.3. Par exemple, à deux jours d'incubation, la minéralisation du phénanthrène en présence de SDS (figure 7.9) ainsi que celle du SDS (figure 7.3) sont observées. Ces résultats indiquent que les microorganismes du sol peuvent effectuer la biodégradation du phénanthrène en présence du SDS.

### **7.2.7 Effet des surfactants sur la consommation d'oxygène du sol**

Afin de vérifier l'effet des deux surfactants étudiés sur la respiration globale du sol, une expérience de respirométrie a été effectuée (voir section 3.5). La figure 7.10 présente l'effet de la présence de 500  $\mu\text{g/g}$  ou bien de SDS, ou bien de surfactants biologiques, sur la consommation d'oxygène du sol contaminé à la créosote.

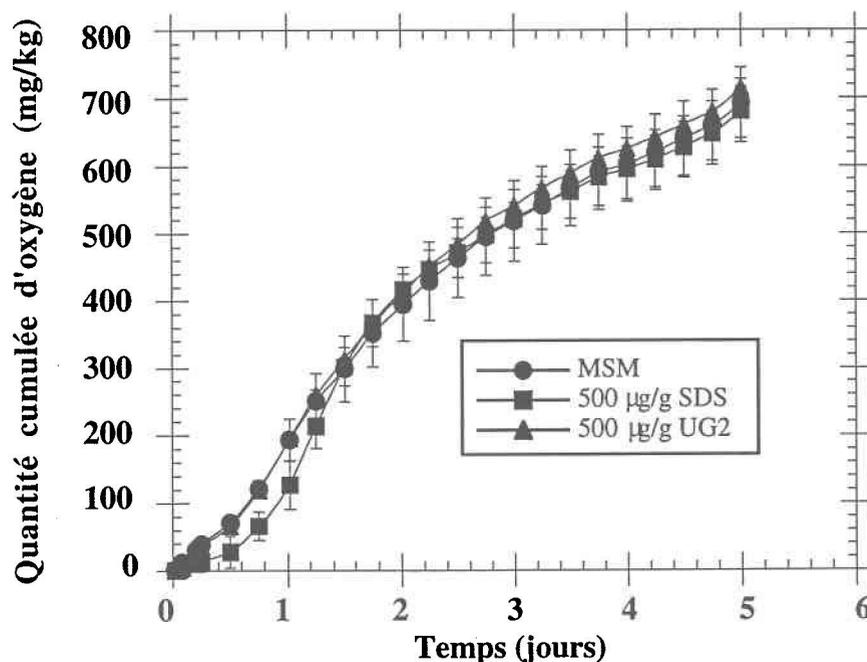


Figure 7.10: Quantité cumulée d'oxygène consommé par le sol contaminé en absence ou en présence de surfactants. Les barres d'erreur représentent une unité de déviation standard d'une moyenne de deux répétitions.

Les résultats montrent que la présence de l'un ou l'autre des deux agents tensioactifs n'a pas affecté de façon importante l'activité biologique globale du sol contaminé, et ceci pour la concentration en surfactants la plus élevée parmi celles utilisées dans l'expérience de biodégradation des HAP. En effet et après 5 jours d'incubation, des consommations totales d'oxygène de 725 mg/kg et de 705 mg/kg ont été obtenues en présence, respectivement, d'agents tensioactifs biologiques et de SDS, comparativement à 730 mg/kg en absence de surfactants.

### 7.3 Discussion

Afin de vérifier l'effet des agents tensioactifs sur la biodégradation des HAP contenus dans le sol contaminé, des conditions favorisant l'activité des microorganismes ont d'abord dû être établies. En fait, une série de facteurs environnementaux peuvent affecter le taux de biodégradation des contaminants dans un sol et il est donc important d'optimiser ces derniers.

Outre la biodisponibilité du contaminant, on retrouve la présence d'une population acclimatée, la température, la quantité d'oxygène, le pH, le pourcentage d'humidité, la disponibilité des nutriments et la présence de composés qui peuvent être toxiques ou compétiteurs (ex. glucose) pour la microflore. Certains de ces facteurs sont discutés dans les prochains paragraphes.

Pour ce qui est de la présence d'une population acclimatée, les résultats ont montré que le sol utilisé contenait la microflore nécessaire à la biodégradation des contaminants étudiés. Il n'y a donc pas eu lieu d'ajouter, dans le sol, des souches exogènes. Une valeur de pH de 7,5 a été déterminée lors de la caractérisation du sol (chapitre 3). Comme le pH recommandé pour la dégradation des hydrocarbures se situe entre 7 et 8 (Dibble et Bartha 1979), le sol possède donc un pH favorisant l'activité de la microflore. De plus, l'utilisation de MSM (pH 7,0) dans les expériences de biodégradation a permis de tamponner le milieu durant toute la période d'expérimentation. La présence d'eau est essentielle lors du processus de biodégradation. Des études portant sur l'effet du contenu en eau sur la biodégradation des hydrocarbures ont montré que la biodégradation était optimale à des valeurs de contenu en eau se situant près de la capacité au champ du sol (Dibble et Bartha 1979). De même, d'autres auteurs ont suggéré, pour l'obtention d'une biodégradation optimale, un contenu en eau se situant entre 30-50 et 80-90% de la capacité au champ du sol (Loehr 1992). Dans les microcosmes, le contenu en eau ajusté à 80% de la capacité au champ a donc permis l'établissement de conditions d'humidité favorables à la biodégradation.

Pour que les microorganismes puissent croître, ces derniers ont également besoin d'une certaine quantité de nutriments, l'azote et le phosphore étant les principaux. Ces nutriments peuvent se retrouver en quantité limitante lorsque le rapport entre le carbone et l'un ou l'autre des deux nutriments excède la valeur requise pour la croissance. Ceci se produit lorsque le sol possède peu ou pas de nutriments ou lorsque ce dernier contient une grande quantité de carbone tels que les contaminants organiques. En général, un rapport C:N:P approximatif de 100:10:1 est souhaitable. Lors de la caractérisation du sol, un rapport C/N de 90 a été obtenu. Ce rapport beaucoup trop élevé montre qu'un apport en azote dans le système est requis. De plus, aucun des ions solubles suivants  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  n'a été détecté lors de la caractérisation initiale du sol. Ces résultats expliquent bien l'augmentation de la consommation d'oxygène du sol contaminé obtenue lors de l'ajout de MSM dans les microcosmes. Des nutriments (MSM) ont donc été ajoutés dans le sol servant aux expériences de biodégradation.

Enfin, durant l'expérience portant sur l'effet des surfactants sur la biodégradation des HAP, le nombre d'hétérotrophes totaux contenus dans le sol contaminé à la créosote est passé d'approximativement  $5,6 \times 10^5$  UFC/g sol sec à  $1,1 \times 10^8$  UFC/g sol sec. Ces résultats indiquent donc que des conditions appropriées pour la croissance des microorganismes étaient présentes durant l'expérience de biodégradation des HAP.

Malgré les bonnes conditions maintenues pour la croissance des microorganismes, le niveau de contamination de l'ensemble des HAP n'a pas été réduit à une valeur inférieure au critère C de la contamination des sols. En effet, pour les HAP formés de 5 et 6 anneaux aucune biodégradation n'a été observée durant les 45 semaines de traitement et ce, avec ou sans surfactants. Ces résultats obtenus pour les HAP de masses molaires élevées sont également très fréquemment rapportés dans la littérature. Il est donc important, avant d'entreprendre un traitement biologique sur un sol contaminé, de considérer la portion de ces contaminants récalcitrants. Si la somme des concentrations en HAP formés de 5 et 6 anneaux est très élevée, il serait bon de penser à combiner la technique proposée à d'autres techniques de restauration pour atteindre les niveaux visés.

Pour ce qui est de l'effet des surfactants sur la biodégradation des HAP, les résultats ont montré que les deux agents tensioactifs étudiés ont significativement affecté, à concentrations élevées, la biodégradation des HAP formés de 4 anneaux, tandis que la dégradation du fluorène et du phénanthrène (3 anneaux) n'a été significativement affectée que par la présence de SDS. Une telle diminution de la biodégradation des HAP par la présence de surfactants peut être attribuée à diverses raisons. Parmi ces dernières, on peut évoquer: 1) la toxicité due à la présence du surfactant lui-même; 2) la toxicité due à la présence des composés intermédiaires de dégradation du surfactant; 3) la toxicité due à la présence de micelles, et: 4) la possible utilisation de l'agent tensioactif par la microflore du sol comme substrat préférentiel.

Dans le cas de la première hypothèse, une expérience de respirométrie a montré, dans la présente étude, que la présence de l'un ou de l'autre des deux agents tensioactifs étudiés, ajoutés en concentration de  $500 \mu\text{g/g}$ , n'a pas affecté de façon importante l'activité microbienne globale (déterminée par la consommation d'oxygène) du sol contaminé à la créosote (figure 7.10). Ces résultats suggèrent que la présence de ces surfactants ne produirait pas d'effet toxique prononcé sur l'activité microbiologique globale du sol contaminé, et ceci pour la concentration en surfactants la plus élevée parmi celles étudiées. Dans le cas du SDS, ce résultat est

compréhensible du fait que le SDS est considéré dans la littérature comme étant un agent tensioactif relativement non toxique et biodégradable (Clarke et al. 1992).

En deuxième hypothèse et en ce qui concerne la formation potentielle dans le milieu de produits métaboliques toxiques, la biodégradation des alkylsulfates tel que le SDS peut mener à la formation de  $\text{SO}_4^{2-}$  avec une possible modification du pH du milieu. L'accumulation éventuelle d'intermédiaires tels que l'acide 4-sulfate butanoïque et l'acide 2-sulfate éthanoïque (White et Russel 1992) durant la dégradation microbienne du SDS peut également se produire. Par exemple, Tiehm (1994) a montré une acidification du milieu de culture par suite de la production de  $\text{HSO}_4^-$  durant la biodégradation du SDS (1,2, 1,6 et 2,0 mM) en phase aqueuse. Cette diminution de la valeur du pH, suite à la biodégradation du SDS, semble avoir été la cause de l'inhibition de la biodégradation du phénanthrène présent dans le milieu. Dans le présent travail, aucune diminution notable du pH du sol ne fut observée après 45 semaines d'incubation. En effet, le pH du sol s'est maintenu entre des valeurs de 7 et 8. Conséquemment, la biodégradation des HAP en présence de l'un ou de l'autre des deux agents tensioactifs étudiés n'a pas été affectée par une diminution de la valeur du pH du sol. L'effet tampon du MSM a possiblement régularisé le pH du sol et l'éventuelle acidification qui aurait pu survenir dans les microcosmes.

Pour ce qui est de la troisième hypothèse, soit la toxicité due à la formation de micelles, une étude a montré que la présence des micelles pouvait arrêter la biodégradation de composés hydrophobes. Dans cette étude (Laha et Luthy 1991), l'interruption complète de la biodégradation du phénanthrène a été observée en présence d'agents tensioactifs non-ioniques dans un système reconstitué sol/eau. Dans ce cas, les concentrations en surfactants utilisées étaient supérieures à la CMC et l'arrêt de la biodégradation du HAP fut expliqué par la présence de micelles dans le milieu qui aurait été toxique pour les microorganismes. La biodisponibilité limitée du phénanthrène à l'intérieur des micelles fut aussi une autre hypothèse émise. Dans le présent travail et en tenant compte de la quantité d'eau présente dans le sol au moment de l'expérience de biodégradation, il est possible d'exprimer la concentration en surfactants (exprimée en  $\mu\text{g/g}$ ) en % (p/v) et de pouvoir ainsi comparer celle-ci en fonction de la CMC de chacun des surfatifs étudiés. De cette façon, la présence de micelles dans l'eau interstitielle du sol peut être déduite et il est possible de vérifier, de façon plutôt qualitative, l'hypothèse de la diminution de la biodégradation des HAP par la présence de micelles. En tenant compte que 18 % (p/p) d'eau était présent dans le sol durant l'expérience de biodégradation, on peut calculer que 0,005%, 0,05% et 0,28% (p/v) de surfactants étaient présents dans l'eau du sol lorsque 10,

100 et 500  $\mu\text{g/g}$  de surfactants étaient ajoutés. Pour le SDS, la CMC étant de 0,23 %, seule la concentration de 500  $\mu\text{g/g}$  se retrouve donc au dessus de sa CMC. Ce n'est donc qu'à cette concentration qu'il y aurait eu formation de micelles par le SDS. Notons que la formation de micelles ne peut cependant pas être assurée si l'on tient compte qu'une partie du SDS ajouté se retrouve probablement adsorbée sur les particules de sol. Cependant, en tenant compte ou non de l'adsorption du SDS, à une concentration de 100  $\mu\text{g/g}$  (0,05 %) de SDS, il peut être assumé qu'il n'y a pas eu formation de micelles. Pourtant, malgré l'absence de micelles à cette concentration en SDS, une diminution significative de la biodégradation des HAP de 3 et 4 anneaux a été néanmoins observée. Cette diminution de la biodégradation ne peut donc pas être reliée à la formation de micelles dans l'eau du sol et l'hypothèse de la diminution de la biodégradation des HAP par la présence des micelles ne peut donc pas être retenue.

En quatrième et dernière hypothèse, les surfactants auraient pu être utilisés comme substrats préférentiels par la microflore du sol. Dans le présent travail, les résultats ont montré que le SDS était très rapidement minéralisé par la microflore indigène du sol contaminé (figure 7.3). De plus, il a été observé (figure 7.9) que la minéralisation du [ $^{14}\text{C}$ ]phénanthrène a eu lieu en présence des trois concentrations de SDS étudiées, et ceci même si le SDS n'était pas complètement biodégradé tel que déduit de la figure 7.3. Ceci confirme que les microorganismes ont été capables d'utiliser ce HAP en présence de SDS. On peut conclure de ces déductions que la présence de SDS en concentrations de 500  $\mu\text{g/g}$  et de 100  $\mu\text{g/g}$  a eu pour effet de ralentir la biodégradation des HAP mais non de l'interrompre complètement. Les agents tensioactifs présents à ces concentrations ont probablement constitué des substrats compétitifs avec les HAP comme source de carbone, ce qui a eu pour effet de diminuer la biodégradation des HAP plus récalcitrants, moins biodisponibles mais toutefois biodégradables, tels que les HAP formés de 4 anneaux. Cette hypothèse est en fait la plus probable si l'on prend en compte la biodégradabilité des deux surfactants étudiés (chapitres 4 et 7 et littérature). Cette hypothèse est également celle récemment émise par Tiehm (1994) qui a utilisé le SDS comme surfactant. En effet, cet auteur a montré une diminution de la biodégradation du phénanthrène préalablement ajouté dans l'eau par la présence de 1,2, 1,6 et 2,0 mM de SDS (0,58, 0,46 et 0,35 g/l) en phase aqueuse. Les résultats ont également montré que le consortium bactérien utilisé, préalablement adapté à la biodégradation du phénanthrène, a rapidement minéralisé le SDS. L'auteur a ainsi suggéré que le SDS a été utilisé préférentiellement comme substrat par le consortium bactérien ajouté dans l'eau.

Une mise en garde doit cependant être apportée quant à l'interprétation et la généralisation des résultats obtenus sur l'action en continu des surfactants ajoutés de façon périodique à toutes les 2 semaines. En effet, les résultats de la biodégradation du SDS ne permettent pas d'extrapoler à une situation pour laquelle un dosage continu de surfactants aurait eu lieu. Selon les travaux de Comeau et al. (1993), la biodégradation complète d'un composé radiomarqué en  $^{14}\text{CO}_2$  se produirait bien avant l'atteinte du maximum de minéralisation. Par exemple, dans une expérience où a été effectué en parallèle le suivi de la concentration du 2,4-D et la minéralisation de ce dernier par la production de  $^{14}\text{CO}_2$ , les résultats ont montré que dans le milieu, le temps requis pour l'enlèvement complet du 2,4-D par biodégradation (soit 2,4 jours) correspondait à un niveau de minéralisation de seulement 26%. La production de  $^{14}\text{CO}_2$  a cependant continué après ce moment pour atteindre un maximum de 58% durant les 2,5 jours suivants (voir figure 3A,B dans Comeau et al. 1993). D'après ce résultat, la biodégradation complète du SDS dans le présent travail se serait produite en moins de 3 jours tel que déduit à la figure 7.3. Toutefois, comme l'ajout de surfactants n'a été faite qu'une fois par 14 jours, que peut-on conclure sur l'effet du SDS alors qu'il n'y en aurait plus pendant la plus grande partie du temps? Il faut cependant prendre en note que les travaux discutés précédemment (Comeau et al. 1993) ont été effectués en phase liquide ce qui implique des réactions biologiques beaucoup plus rapides. Dans le cas du présent travail, la minéralisation du SDS a été vérifiée en phase solide dans laquelle l'adsorption du surfactant sur les particules de sol entrainait en jeu. Ce dernier processus implique donc une biodégradation plus lente du surfactant étudié et le temps nécessaire à la biodégradation complète du SDS est donc plus difficile à évaluer. Quoiqu'il en soit, si l'on compare le présent travail à la presque totalité des études portant sur le sujet dans lesquelles une seule addition de surfactant est effectuée au début des expériences, les conditions utilisées ici se rapprochent d'un dosage continu. Une attention doit néanmoins être prise sur le fait que les surfactants ajoutés ne sont peut-être pas toujours présents durant toute la période de 2 semaines.

Finalement, puisque de nombreuses interactions complexes existent entre les microorganismes, les composés hydrophobes et les surfactants, d'autres recherches sont requises pour mieux comprendre l'effet des agents tensioactifs utilisés dans les biotechnologies environnementales. D'autres hypothèses peuvent être émises quant à la diminution de la biodégradation des composés hydrophobes par les surfactants telle que la toxicité due à une plus grande concentration de HAP dans la phase aqueuse suite à leur solubilisation par le surfactant. Aussi, l'impact des agents tensioactifs sur la croissance ou l'activité des microorganismes qui minéralisent les contaminants organiques devrait être étudié dans des milieux bien définis et

contrôlés afin de connaître si la biodégradation du composé cible est affectée par 1) les propriétés chimiques intrinsèques dont la toxicité du surfactant lui-même, ou par 2) des interactions spécifiques surfactants-substrats se traduisant notamment par une possible biodisponibilité limitée des contaminants contenus dans les micelles. Par exemple, une étude a montré que des surfactants biologiques produits en présence de glucose ou d'huile végétale avaient presque complètement inhibé la biodégradation de contaminants de la gazoline, tandis que les surfactants produits par les mêmes souches en présence de gazoline n'avaient pas eu d'impact négatif sur cette biodégradation (Falatko et Novak 1992).

En fait, les résultats de ces études dépendent grandement du type d'agent tensioactif utilisé. Par exemple, dans une autre étude à l'intérieur de laquelle six surfactants ont été étudiés pour leur capacité éventuelle à augmenter le taux de minéralisation du carbone contenu dans une boue huileuse, seulement deux agents tensioactifs ont montré des résultats positifs (Rasiah et Voroney 1993). Des auteurs ont même démontré récemment qu'il existait une relation entre l'impact des surfactants biologiques (rhamnolipides) sur la biodégradation de composés hydrophobes tels que l'hexadécane, et l'effet de ces surfactants sur l'hydrophobicité des cellules des souches de bactéries impliquées (Zhang et Miller 1994). En effet, les rhamnolipides étudiés ont eu pour effet d'augmenter l'hydrophobicité des cellules bactériennes qui, avant l'ajout des surfactants, ne dégradait que très lentement l'hydrocarbure.

Aussi et puisque la biodégradabilité des agents tensioactifs est importante à considérer lors du choix d'un surfactant dans le cas, par exemple, d'un traitement *in situ*, l'impact de la biodégradation des surfactants sur la biodégradation des composés cibles demeure un sujet de recherche qui doit être approfondi dans les études futures. En effet et même si l'utilisation des agents tensioactifs étudiés comme substrat semble être la cause de la diminution de la biodégradation des HAP dans le présent travail, les résultats d'autres travaux ont montré au contraire que la biodégradation des surfactants pouvait avoir un effet positif sur la dégradation biologique des composés hydrophobes tels que les hydrocarbures. Par exemple, Rasiah et Voroney (1993), en testant six surfactants différents, ont montré que la plus grande augmentation du taux de minéralisation du carbone présent dans des boues huileuses (provenant d'une raffinerie de pétrole) fut observée en présence de l'agent tensioactif le plus biodégradé. Les auteurs ont suggéré que le co-métabolisme du surfactant et des boues huileuses était le facteur expliquant cette augmentation de la biodégradation. Encore dans la perspective de l'effet de la biodégradation des surfactants sur la biodégradation des contaminants, une autre hypothèse

liée à la diminution de la biodégradation des HAP dans le présent travail est le développement éventuel d'autres souches bactériennes qui auraient utilisé les agents tensioactifs comme source de carbone. La croissance de ces nouvelles souches de bactéries en présence des surfactants ajoutés par intervalles périodiques dans le milieu aurait pu être favorisée au détriment des microorganismes impliqués dans la biodégradation des HAP.

Des recherches devraient être également effectuées sur l'identification et la caractérisation des différentes souches microbiennes impliquées dans les différents processus discutés afin de vérifier si des souches différemment compétentes sont présentes à la fois et s'il y a lieu, de connaître l'impact de la présence d'une souche sur l'activité de l'autre souche.

Les résultats obtenus dans le présent chapitre constituent des résultats scientifiques originaux quant à l'utilisation des surfactants étudiés dans des sols réellement contaminés. Dans les études portant sur le sujet et qui sont pour la plupart effectuées en systèmes reconstitués, la microflore est souvent restreinte à l'ajout de microorganismes sélectionnés qui ne sont pas représentatifs de la microflore indigène présente dans un sol réellement contaminé. De plus, il a été montré dans la littérature que la biodégradabilité et la biodisponibilité des contaminants n'étaient pas les mêmes dans un sol réellement contaminé où les contaminants sont adsorbés dans le sol depuis une longue période de temps. Enfin, les résultats obtenus indiquent qu'il est impératif de continuer les recherches dans le domaine de la biodisponibilité des contaminants hydrophobes pour le développement de biotechnologies efficaces.

## 7.4 Conclusions

En résumé, les principales conclusions qui peuvent être tirées des résultats obtenus dans le présent chapitre sont:

- Ajoutés en concentration de 10  $\mu\text{g/g}$ , les deux agents tensioactifs étudiés n'ont pas affecté de façon significative la biodégradation des HAP formés de 3 et 4 anneaux
- L'addition de 100 et 500  $\mu\text{g/g}$  des surfactants étudiés a diminué la biodégradation des HAP formés de 4 et 5 anneaux, l'effet étant plus important pour le SDS.
- Les HAP formés de 5 anneaux et plus n'ont pas été biodégradés
- Le [ $^{14}\text{C}$ ]SDS a été très rapidement minéralisé par la microflore indigène du sol.
- Les surfactants ont probablement été utilisés comme substrats préférentiels ce qui a eu pour effet de diminuer la biodégradation des HAP plus récalcitrants tels que les HAP formés de 4 anneaux.

## CHAPITRE 8: PERSPECTIVES POUR LA RESTAURATION DES SOLS ET POUR LA PROTECTION DE L'EAU SOUTERRAINE

---

Les deux agents tensioactifs étudiés dans cette étude ont été efficaces pour mobiliser les HAP âgés présents dans un sol contaminé à la créosote. Ceci suggère que ces surfactants pourraient être avantageusement utilisés dans des techniques de traitement de sol telles que l'extraction *in situ* des contaminants hydrophobes. Les agents tensioactifs biologiques utilisés ont été plus efficaces que le SDS, ceci pour un important domaine de concentrations en surfactants. Ce résultat implique que les surfactants biologiques étudiés peuvent être utilisés en plus petite quantité pour obtenir la même efficacité que celle présentée par le SDS. Des coûts moins importants pourraient alors être attribués à l'utilisation des agents tensioactifs biologiques. Cependant, des études démontrant la rentabilité de la production, à grande échelle, des surfactants biologiques doivent être effectuées. La production *in situ* de surfactants biologiques par certaines souches bactériennes de la microflore d'origine du sol peut être envisagée comme application future sans compter que cette éventualité permettrait de réduire les coûts de production.

Dans le cas d'un traitement *in situ*, l'augmentation de la concentration apparente des HAP dans la phase aqueuse peut comporter de grands risques. En effet, l'augmentation de la mobilisation des contaminants par les surfactants peut contribuer à la dispersion de ces contaminants dans l'aquifère et à la mise en circulation dans l'eau souterraine de contaminants réputés immobiles (fortement adsorbés) et très toxiques. Par exemple et dans le présent travail, l'augmentation de la concentration en surfactants a contribué à la mobilisation de HAP toxiques de masse molaire élevée tels que le benzo(a)pyrène qui n'est que très peu soluble dans l'eau pure. Dans un tel cas, un suivi et un contrôle efficace du transport des contaminants solubilisés doivent être mis en place afin de prévenir la contamination de la nappe d'eau souterraine dans les sections de l'aquifère auparavant non contaminées. Dans le cas d'un traitement *ex situ*, le traitement ultérieur des lixiviats ou des eaux de lavages devient une nécessité avant leur rejet.

Un des principaux problèmes associés à l'injection de surfactants dans la zone saturée lors d'un traitement *in situ* est le blocage des pores du sol par la présence des agents tensioactifs. Par

exemple, les agents tensioactifs anioniques sont susceptibles de précipiter dans le sol tel que cela a été montré dans d'autres études pour le SDS et peuvent ainsi contribuer à la diminution de la conductivité hydraulique du sol. Dans la perspective d'un traitement *in situ*, le contrôle de cette précipitation serait difficile et le blocage des pores du sol en plus de la perte du surfactant par précipitation ne pourraient pas être empêchés. Des mélanges de surfactants pourraient cependant réduire ces pertes de surfactants par précipitation.

Enfin, l'adsorption des agents tensioactifs est aussi importante à déterminer lors de la mise en place d'un traitement de sol utilisant ces derniers. Afin de limiter la perte de surfactants par adsorption sur le sol, l'utilisation d'agents tensioactifs anioniques est recommandée. En effet, ces surfactants sont moins susceptibles à l'adsorption sur les surfaces minérales à cause de leur charge négative. Cependant et dans la présente étude, les résultats ont montré que la présence de sol avait une grande influence sur la concentration en phase aqueuse des agents tensioactifs biologiques étudiés. Ces facteurs sont importants à considérer si on tient compte du fait qu'une efficacité maximale est le premier critère de sélection d'un surfactant pour la viabilité d'un procédé de remédiation des sols contaminés impliquant l'utilisation d'agents tensioactifs.

Les résultats obtenus dans la présente étude ont également montré que l'addition de SDS ou des agents tensioactifs produits par la souche bactérienne *P. aeruginosa* UG2 n'était pas efficace, sous les conditions étudiées, pour améliorer le biotraitement d'un sol contaminé à la créosote. À certaines concentrations, leur ajout a même ralenti et diminué la biodégradation des HAP. Par ailleurs, les expériences utilisant le [ $\alpha$ - $^{14}$ C]SDS ont montré que ce surfactant était très rapidement minéralisé par la microflore indigène du sol. D'un point de vue pratique, la biodégradabilité d'un agent tensioactif est un facteur important à prendre en compte. En effet, si un traitement *ex situ* tel qu'un traitement en biopile ou en bioréacteur mélangé est utilisé pour la restauration du sol, la biodégradabilité des agents tensioactifs implique qu'une concentration adéquate de surfactants, aussi bien qu'une fréquence d'addition, doivent être déterminées avant le traitement afin d'assurer une action efficace des surfactants durant toute la période de traitement.

Dans le cas d'un traitement *in situ* pour lequel la persistance des agents tensioactifs dans la nappe d'eau souterraine est un point important à considérer, la biodégradabilité des surfactants comporte un grand avantage. En effet, une biodégradabilité élevée des surfactants implique qu'il y aura moins de risques de contamination ultérieure du site par les surfactants eux-mêmes ou par le transport des contaminants avec les surfactants vers d'autres zones non contaminées une fois leur application terminée. Comme dans le cas d'un traitement *ex situ*, les agents tensioactifs

devraient être injectés en concentration et selon une séquence d'injection préalablement déterminées.

En fait, les résultats montrent que, pour un traitement biologique avec ou sans déplacement du sol, des tests préliminaires devraient être effectués afin de vérifier si la biodégradation des surfactants employés affecte celle des contaminants cibles. Par exemple et si les agents tensioactifs sont utilisés comme substrat préférentiel par la microflore indigène, un important ralentissement ou même l'arrêt de la biodégradation des contaminants plus récalcitrants peut se produire. Toujours dans la perspective d'un traitement biologique, d'autres phénomènes peuvent également survenir lors de l'ajout de surfactants, tels que la possible toxicité des surfactants, ou de leurs composés intermédiaires de dégradation, pour les microorganismes. La biodisponibilité des contaminants présents dans les micelles de surfactants est aussi importante à considérer lorsque les surfactants sont utilisés à des concentrations supérieures à leur concentration micellaire critique effective. Beaucoup de recherches doivent ainsi être réalisées sur le comportement et le devenir des surfactants dans le sol et l'eau afin de développer des techniques efficaces de biorestauration impliquant l'utilisation d'agents tensioactifs. En effet, les interactions complexes qui existent entre les microorganismes, les composés organiques hydrophobes, les différents surfactants disponibles ainsi que les phases liquide et solide incitent à une grande prudence lors de l'utilisation de surfactants dans les biotechnologies de restauration des sols contaminés.

## CHAPITRE 9: CONCLUSION GÉNÉRALE

---

L'objectif principal de ce travail était de vérifier l'effet de deux agents tensioactifs anioniques sur la mobilisation et la biodégradation des HAP contenus dans un sol contaminé à la créosote. L'hypothèse de travail était basée sur le fait que les surfactants, en augmentant la mobilisation des HAP hydrophobes, pouvaient augmenter la biodisponibilité et donc la biodégradation de ces derniers. En fait, la production d'agents tensioactifs biologiques a souvent été associée à la biodégradation des composés organiques hydrophobes. Puisque la souche *P. aeruginosa* UG2 était connue pour produire des rhamnolipides ayant la propriété d'agir sur la tension de surface et, puisque cette souche fut à l'origine isolée d'un site contaminé aux hydrocarbures, il était alors intéressant d'utiliser celle-ci afin de vérifier l'hypothèse émise. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus en présence d'un surfactant chimique (SDS).

Les propriétés tensioactives des deux surfactants ont d'abord été vérifiées. Leur efficacité a été évaluée par la détermination de la diminution de la tension de surface et par l'estimation de la valeur de la CMC. Les deux surfactants ont eu pour effet de diminuer de façon importante la tension de surface de l'eau, la plus grande efficacité ayant été observée avec les rhamnolipides. Les rhamnolipides présentent une CMC bien inférieure à celle du SDS. Afin d'obtenir la formation de micelles en milieu aqueux, une plus grande quantité de SDS est donc nécessaire. Les rhamnolipides produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 ont donc montré une plus grande efficacité que le surfactant chimique.

Le développement d'une méthode d'extraction des HAP efficace et reproductible a également été réalisé. L'utilisation d'un fluide supercritique a montré un bon potentiel pour l'extraction des HAP contenus dans le sol contaminé. En effet, et lorsque comparé aux résultats obtenus avec la méthode standard d'extraction au Soxhlet, de bons rendements d'extraction ont été obtenus avec le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) comme fluide. Malgré ces résultats, l'utilisation du fluide supercritique a été abandonnée du fait que cette méthode n'était pas reproductible et que des expériences supplémentaires auraient été nécessaires pour l'obtention d'une méthode satisfaisante. Par ailleurs, un rendement d'extraction satisfaisant a été obtenu avec la méthode d'extraction en tubes. Contrairement à l'utilisation du fluide supercritique, l'extraction en tubes a montré une très bonne reproductibilité d'extraction. De plus, la présence des agents tensioactifs étudiés

n'a pas eu d'effet sur le rendement de l'extraction. La méthode en tubes a donc été choisie pour effectuer l'extraction des HAP contenus dans le sol contaminé.

Les deux agents tensioactifs étudiés ont été efficaces pour mobiliser les HAP contenus dans le sol contaminé. L'augmentation de la concentration apparente des HAP en phase aqueuse a été fonction de la concentration en surfactant. L'addition de surfactants a eu pour effet de mobiliser des HAP de masse molaire élevée qui sont très peu solubles dans l'eau pure. Pour une même concentration en agents tensioactifs, les rhamnolipides produits par la souche *P. aeruginosa* UG2 ont été plus efficaces que le SDS.

L'utilisation des agents tensioactifs pour augmenter la mobilisation des composés hydrophobes contenus dans un sol semble très prometteuse. Cependant, l'adsorption des surfactants au sol demeure un facteur important à considérer et à étudier. Les recherches portant sur la structure des micelles formées sont très intéressantes car elles permettent de mieux comprendre le mécanisme de solubilisation impliqué. Finalement, afin d'augmenter l'efficacité des surfactants pour l'extraction des contaminants lors d'un traitement *in situ*, les recherches permettant de diminuer le blocage des pores du sol et les pertes d'agents tensioactifs par précipitation demeurent également une préoccupation importante. Ainsi, les résultats obtenus en milieux statiques et en laboratoire doivent être complétés sous des conditions de terrain afin de confirmer le potentiel de transfert des méthodes de traitement développées.

L'effet des deux agents tensioactifs sur la biodégradation des HAP contenus dans le sol contaminé à la créosote a ensuite été vérifié. Les résultats ont montré que la présence de l'un ou de l'autre des surfactants étudiés n'a pas d'effet positif sur la biodégradation des HAP. Au contraire, aux concentrations de 100  $\mu\text{g/g}$  et de 500  $\mu\text{g/g}$ , la présence des deux agents tensioactifs a diminué de façon significative la biodégradation du fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène et chrysène (4 anneaux). Pour tous les HAP qui ont été dégradés, l'effet négatif a été plus important en présence de SDS. Par ailleurs, l'addition de 10  $\mu\text{g/g}$  de l'un ou de l'autre des deux surfactants n'a pas affecté de façon significative la biodégradation des HAP. Puisqu'il a été montré que le SDS a été dégradé très rapidement par la microflore indigène du sol, les surfactants ont probablement été utilisés comme substrats préférentiels, pour ainsi contribuer au ralentissement de la biodégradation des HAP plus récalcitrants.

Malgré le problème de la biodisponibilité des contaminants hydrophobes, peu de travaux ont été réalisés sur le potentiel de biodégradation des polluants adsorbés. L'utilisation d'un sol réellement contaminé par des résidus âgés est d'autant plus inédite que la plupart des études dans ce domaine ont été réalisées avec des composés chimiques purs ajoutés à des systèmes reconstitués. Les résultats obtenus dans la présente étude représentent donc des informations importantes et pertinentes pour une évaluation représentative de l'efficacité d'un biotraitement. En regard des résultats obtenus, des recherches plus approfondies sont cependant nécessaires pour comprendre l'effet des surfactants utilisés dans les technologies environnementales. Les résultats ont montré que la biodégradabilité des surfactants utilisés pouvait diminuer le rendement de biodégradation des composés plus récalcitrants tels que les HAP. Cependant, la dégradabilité des agents tensioactifs demeure une propriété importante pour l'utilisation de ceux-ci dans les technologies environnementales et l'effet de la biodégradation des surfactants sur la biodégradation des composés cibles est donc un sujet de recherche à approfondir. Par ailleurs, des recherches portant sur l'identification des populations microbiennes impliquées dans le métabolisme des différents substrats seraient intéressantes. Il serait alors possible de déterminer si des populations différentes sont impliquées de façon synergique ou antagoniste, ou si une seule population compétente est affectée par la présence d'un substrat très biodégradable qui ralentit ainsi la biodégradation d'un substrat plus récalcitrant. En fait, des interactions complexes existent entre les agents tensioactifs, les composés hydrophobes et les microorganismes. La présence de la molécule de surfactant, de ses micelles ou même de ses composés intermédiaires de biodégradation peut être toxique pour les microorganismes. La biodisponibilité des contaminants contenus à l'intérieur des micelles de surfactant est également importante à considérer si les agents tensioactifs sont utilisés à des concentrations supérieures à celles de leur concentration micellaire critique effective. Beaucoup de recherches restent ainsi à faire dans ce domaine.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Abdul, A. S. et T. L. Gibson (1991). Laboratory studies of surfactant-enhanced washing of polychlorinated biphenyl from sandy material. *Environ. Sci. Technol.* 25 (4): 665-671.
- Abdul, A. S., T. L. Gibson et D. N. Rai (1990). Selection of surfactants for the removal of petroleum products from shallow sandy aquifers. *Ground Water*, 28: 920-926.
- Abdul, A. S., T. L. Gibson, C. C. Ang, J. C. Smith et R. E. Sobczynski (1992). In situ surfactant washing of polychlorinated biphenyls and oils from a contaminated site. *Ground Water*, 30: 219-231.
- Al-Bashir, B., T. Cseh, R. Leduc et R. Samson (1990). Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrifying conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 414-419.
- Allred, B. et G. O. Brown (1994). Surfactant-induced reductions in soil hydraulic conductivity. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 14: 174-184.
- Anonyme (1993). Dictionnaire des techniques et technologies modernes. Français-anglais. Technique et documentation Lavoisier, J.R. Forbes. Paris..
- Anonyme (1992). Larousse. Trois volumes en couleurs. Librairie Larousse. Paris
- Ang, C. C. et A. S. Abdul (1991). Aqueous surfactant washing of residual oil contamination from sandy soil. *Ground Water Monitor. Rev.*, 11: 121-127.
- Aprill, W. et R. C. Sims (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, 20: 253-265.
- Aronstein, B. N. et M. Alexander (1993). Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 39: 386-390.
- Aronstein, B. N. et M. Alexander (1992). Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries. *Environ.Toxicol. Chem.*, 11: 1227-1233.
- Aronstein, B. N., Y. M. Calvillo et M. Alexander (1991). Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.*, 25: 1728-1731.
- Berg, G., A. G. Seech, H. Lee et J. T. Trevors (1990). Identification and characterization of a soil bacterium with extracellular emulsifying activity. *J. Environ. Sci. Health*, A25(7): 753-764.
- Bjorseth, A. et T. Ramdahl (1985). *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons: emissions sources and recent progress in analytical chemistry: Sources and emissions of PAH*. New York, A. Bjorseth et T. Ramdahl (eds), 416 p. volume 2.
- Bossert, I. D. et R. Bartha (1986). Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 37: 490-495.
- Boyd, S. A. et S. Sun (1990). Residual petroleum and polychlorobiphenyl oils as sorptive phases for organic contaminants in soils. *Environ. Sci. Technol.*, 24: 142-144.
- Brickell, J. L. et T. M. Keinath (1991). The effect of surfactants on the sorption partition coefficients of naphthalene on aquifers soils. *Water Sci. Technol.*, 23: 455-463.
- Bury, S. J. et C. A. Miller (1993) Effect of micellar solubilization on biodegradation rates on hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, 27: 104-110.
- Cerniglia, C. E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.*, 30: 31-71.
- Cerniglia, C. E. et D. T. Gibson (1979). Oxidation of benzo[a]pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *J. Biol. Chem.*, 254: 12174-12180.

- Chiang, T. C., C. A. Valkenburg et D. A. Miller (1989). *Performance testing of method 1312 QA support for RCRA testing: project report*. Environ. Monitor. Systems Lab., Las Vegas, Nevada, USA, USEPA report No. 600/4-89/022.
- Clarke, A. N., R. D. Mutch Jr., D. J. Wilson et K. H. Oma (1992). Design and implementation of pilot scale surfactant washing/flushing technologies including surfactant reuse. *Water Sci. Technol.*, 26: 127-135.
- Comeau, Y., C. W. Greer et R. Samson. Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 681-687.
- Cooper, D. G. and J. E. Zajic (1980). Surface-active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, 26: 229-253.
- Dennis, M. J., R. C. Massey, G. Cripps, I. Ven, N. Howarth et G. Lee (1991). Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Additives and Contaminants*, 8(4): 517-530.
- Dibble, J. T. et R. Bartha (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 729-739.
- DiToro, D.M., L. J. Dodge et V. C. Hand (1990). A model for anionic surfactant sorption. *Environ. Sci. Technol.*, 24: 1013-1020.
- Ducreux, J., D. Ballerini et C. Bocard (1994). *Hydrocarbon bioremediation: The role of surfactants in enhanced in situ bioremediation*. Boca Raton, R. E. Hinchee, B. C. Alleman, R. E. Hoeppe et R. N. Miller (eds), 477 p.
- Dzombak, D. A. et R. G. Luthy (1984). Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils. *Soil Sci.*, 137: 292-308.
- Edwards, D. E., Z. Liu et R. G. Luthy (1994a). Surfactant solubilization of organic compounds in soil/aqueous systems. *J. Environ. Eng.*, 120: 5-22.
- Edwards, D. E., Z. Liu et R. G. Luthy (1994b). Experimental data and modeling for surfactant micelles, HOCs and soil. *J. Environ. Eng.*, 120: 23-41.
- Edwards, D. E., Z. Liu et R. G. Luthy (1992). Interactions between nonionic surfactant monomers, hydrophobic organic compounds and soil. *Water Sci. Technol.*, 26: 147-158.
- Edwards, D. A., R. G. Luthy et Z. Liu (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.*, 25: 127-133.
- Efroymsen, R. A. et M. Alexander (1991). Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1441-1447.
- Ellis, B., P. Harold et H. Kronberg (1991). Bioremediation of a creosote contaminated site. *Environ. Technol.*, 12: 447-459.
- Erickson, D. C., R. C. Loehr et E. F. Neuhauser (1993). PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Res.*, 27: 911-919.
- Falatko, D. M. et J. T. Novak (1992). Effets of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environ. Res.*, 64:163-169.
- Feenstra, S. et J. A. Cherry (1990). Groundwater contamination by creosote. Dans: *The Eleventh Annual Meeting of the Canadian Wood Preserving Association*, 16 p. Toronto, Ontario, 6-7 novembre.
- Foght, J. M., D. L. Gutnick et D. W. S. Westlake (1989). Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(1): 36-42.
- Gee, G. W. et J. W. Bauder (1986). *Method of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods: Particle-size analysis*. New York, A. L. Page, R. H. Miller et D. R. Keeney (eds), 384-411.
- Germain, A. et M. Bisson (1992). Mesure d'hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'air ambiant au Québec. Dans: *5ième Colloque sur les Substances Toxiques*, 263 p. Montréal, Québec, 1-2 avril 1992.

- Gibson, D. T. et V. Subramanian (1984). *Microbial degradation of organic compounds. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*. New York, D. T. Gibson (ed.), 576 p. Microbiology series, volume 13.
- Gibson, T. D., V. Mahadevan, D. M. Jerina, H. Yagi et H. J. C. Yeh (1975). Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, 189: 295-297.
- Gonthier, C. (1992). Les HAP et leurs sources au Canada. Dans: *5ième Colloque sur les Substances Toxiques*, 263 p. Montréal, Québec, 1-2 avril 1992.
- Graves, D. A., C. A. Lang et M. E. Leavitt (1991). Respirometric analysis of the biodegradation of organic contaminants in soil and water. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28/29: 813-826.
- Greer, C. W., J. Hawari et R. Samson (1990). Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch. Microbiol.*, 154: 317-322.
- Guerin, W. F. et S. A. Boyd (1990). *Influence of sorption/desorption processes on the bioavailability of organic contaminants*. Department of Energy, Washington, DC, USA, report No DOE/ER/60809--2.
- Guerin, W. F. et G. E. Jones (1988). Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 937-944.
- Guerra-Santos, L., O. Käppeli et A. Fiechter (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbone source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(2): 301-305.
- Gutnick, D. L. et W. Minas (1987). Perspectives on microbial surfactants. *Biochem. Soc. Trans.*, 15: 22S-35S.
- Hand, V. C. et G. K. Williams (1987). Structure-activity relationships for sorption of linear alkylbenzenesulfonates. *Environ. Sci. Technol.*, 21: 370-373.
- Harvey, S., I. Elashvili, J. J. Valdes, D. Kamely et A. M. Chakrabarty (1990). Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio/Technology*, 8: 228-230.
- Hatzinger, P. B. et M. Alexander (1995). Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.*, 29: 537-545.
- Hawthorne, S. B. (1990). Analytical-scale supercritical fluid extraction. *Anal. Chem.*, 62: 633A-642A.
- Hawthorne, S. B. et D. J. Miller (1987). Directly coupled supercritical fluid extraction-gas chromatographic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls from environmental solids. *J. Chromatogr.*, 403: 63-76.
- Hawthorne, S. B. et D. J. Miller (1986). Extraction and recovery of organic pollutants from environmental solids and Tenax-GC using supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Chromatogr. Sci.*, 24: 258-264.
- Hawthorne, S. B., J. J. Langenfeld, D. J. Miller et M. D. Burford (1992). Comparaison of supercritical CHClF<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> for the extraction of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.*, 64: 1614-1622.
- Heitkamp, M. A. et C. E. Cerniglia (1987). Effect of a chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6: 535-546.
- Herbes, S. E. et L. R. Schwall (1978). Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 306-316.
- Hommel, R. K. (1990). Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodegradation*, 1: 107-119.

- Hunt, W. P., K. G. Robinson et M. M. Ghosh (1994). *Hydrocarbon Bioremediation: The role of biosurfactants in biotic degradation of hydrophobic organic compounds*. Boca Raton, R. E. Hinchee, B. C. Alleman, R. E. Hoeppe et R. N. Miller (eds), 477 p.
- Jafvert, C. T. (1991). Sediment- and saturated-soil-associated reactions involving an anionic surfactant (dodecylsulfate). 2. Partition of PAH compounds among phases. *Environ. Sci. Technol.*, 25(6): 1039-1045.
- Jafvert, C. T. et J. K. Heath (1991). Sediment- and saturated-soil-associated reactions involving an anionic surfactant (dodecylsulfate). 1. Precipitation and micelle formation. *Environ. Sci. Technol.*, 25: 1031-1038.
- Jain, D. K., H. Lee et J. T. Trevors (1992). Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J. Ind. Microbiol.*, 10: 87-93.
- Juwarker, A., J. T. Trevors et H. Lee (1993). Hydrocarbon partitioning in soil slurries by biosurfactant from *Acinetobacter radioresistens*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 8: 95-98.
- Karickhoff, S. W., D. S. Brown et T. A. Scott (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res.*, 13: 241-248.
- Kauser, J. et W. J. Maier (1992). Biodegradation of phenanthrene in the presence of nonionic surfactants. Dans: *47th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings*, 177-184. Chealsea, Michigan, 1992.
- Keck, J., R. C. Sims, M. Coover, K. Park et B. Symons (1989). Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Water Res.*, 12: 1467-1476.
- Kerr, R. S. (1990) *Basics of pump-and-treat ground-water remediation technology*. R. S. Kerr Environ. Res. Lab., Ada, OK, USA, USEPA report No. 600/8-90/003.
- Kile, D. E. et C. T. Chiou (1989). Water solubility enhancement of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above the critical micelle concentration. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 832-838.
- Koch, A. K., O. Käppeli, A. Fiechter et J. Reiser (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.*, 173 (13): 4212-4219.
- Kosaric, N., N. C. Gray et W. L. Cairns (1983). *Biotechnology: Microbial emulsifiers and de-emulsifiers*. Weinheim, H. J. Rehm et G. Reed (eds), 575-592. volume 3.
- Kukkonen, J., J. F. Mc Carthy et A. Oikari (1990). Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19: 551-557.
- Laha, S. et R. G. Luthy (1992). Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 1367-1380.
- Laha, S. et R. G. Luthy (1991). Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.*, 25: 1920-1930.
- Lavalin Environnement (1990). *Étude sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques: technologies de réduction des émissions et besoins de développement*. Montréal, Québec. Rapport effectué pour Environnement Canada, Direction de la Protection de l'Environnement.
- Leahy, J. G. et R. R. Colwell (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, 54: 305-315.
- Lewis, D. L., H. P. Kollig et R. E. Hodson (1986). *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 598-603.
- Liu, Z., D. A. Edwards et R. G. Luthy (1992a). Nonionic surfactant sorption onto soil. *Water Sci. Technol.*, 26(9-11): 2337-2340.
- Liu, Z., D. A. Edwards et R. G. Luthy (1992b). Sorption of non-ionic surfactants onto soil. *Water Res.*, 26(10): 1337-1345.
- Liu, Z., S. Laha, et R. G. Luthy (1991). Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in soil-water suspensions. *Water Sci. Technol.*, 23: 475-485.

- Loehr, R. C. (1992). *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater: Bioremediation of PAHs compounds in contaminated soil*. New York, E. J. Calabrese et P. T. KostECKI (eds), 558 p.
- Lopez-Avila, V., N. S. Dodhiwala et W. F. Beckert (1990). Supercritical fluid extraction and its application to environmental analysis. *J. Chromatogr. Sci.*, 28: 468-476.
- MacElwee, C. G., H. Lee et J. T. Trevors (1990). Production of extracellular emulsifying agent by *Pseudomonas aeruginosa* UG1. *J. Ind. Microbiol.*, 5: 25-32.
- Majors, R. E. (1990). Supercritical fluid extraction- an introduction. *LC-GC*, 9: 78-84.
- Manilal, V. B. et M. Alexander (1991). Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 401-405.
- Martel, R., P. J. GélinaS, J. E. Desnoyers et A. Masson (1993). Phase diagrams to optimize surfactant solutions for oil and DNAPL recovery in aquifers. *Ground Water*, 31: 789-800.
- McGinnis, G. D., H. Borazjani, L. K. McFarland, D. F. Pope et D. A. Strobel (1988). *Characterisation and laboratory testing soil treatability studies for creosote and pentachlorophenol sludges and contaminated soil*. R. S. Kerr Environ. Res. Lab., Ada, OK, USA, USEPA report No. 600/2-88/055.
- Means, J. C., S. G. Wood, J. J. Hassett et W. L. Banwart (1980). Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.*, 14(12): 1524-1528.
- Menichini, E., A. Bocca, F. Merli, D. Ianni et F. Monfredini (1991). Polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils on the Italian market. *Food Additives and Contaminants*, 8(3): 363-369.
- MENVIQ (1988). *Guide standard de caractérisation de terrains contaminés*. Direction des substances dangereuses, Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, Canada, rapport no. QEN/SD-2.
- Menzie, C. A., B. B. Potocki et J. Santodonato (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, 26(7): 1278-1284.
- Mihelcic, J. R. et R. G. Luthy (1988a). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(5): 1182-1187.
- Mihelcic, J. R. et R. G. Luthy (1988b). Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(5): 1188-1198.
- Mihelcic, J. R., D. R. Lueking, R. J. Mitzell et J. M. Stapleton (1993). Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. *Biodegradation*, 4: 141-153.
- Morgan, P. et R. J. Watkinson (1989). Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 8(4): 305-333.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman et P. H. Pritchard (1989). Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(12): 3085-3089.
- Mueller, J. G., S. E. Lantz, B. O. Blattmann et P. J. Chapman (1991). Bench-scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol- and creosote-contaminated materials: solid-phase bioremediation. *Environ. Sci. Technol.*, 25(6): 1045-1055.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman, B. O. Blattmann et P. H. Pritchard (1990). Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(4): 1079-1086.
- Oberbremer, A. et R. Müller-Hurtig (1989). Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 582-586.

- Oberbremer, A., R. Müller-Hurtig et F. Wagner (1990). Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 485-489.
- Park, K. S., R. C. Sims et R. R. Dupont (1990). Transformation of PAHs in soil systems. *J. Environ. Eng.*, 116: 632-641.
- Parkinson, M. (1985). Bio-surfactants. *Biotechnol. Adv.*, 3: 65-83.
- Parra, J. L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercadé, F. Comelles et M. P. Bosch (1989). Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66: 141-145.
- Pennell, K. D., L. M. Abriola et W. J. Weber, Jr. (1993). Surfactant-enhanced solubilization of residual dodecane in soils columns. 1. Experimental investigation. *Environ. Sci. Technol.*, 27: 2332-2340.
- Providenti, M. A. (1994). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula and biosurfactants on phenanthrene mineralization by *Pseudomonas* sp. UG14. Master Thesis. January 1994, University of Guelph, 142 p.
- Rasiah, V. et R. P. Voroney (1993). Assessment of selected surfactants for enhancing C mineralization of an oily waste. *Water, Air and Soil Pollut.* 71: 347-355.
- Rittmann, B. E. et N. M. Johnson (1989). Rapid biological clean-up of soils contaminated with lubricating oil. *Water Sci. Technol.*, 21: 209-219.
- Robinson, K. G., W. S. Farmer et J. T. Novak (1990). Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Water Res.*, 24(3): 345-350.
- Rosenberg, E. (1986). Microbial surfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 3: 109-132.
- Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz et D. L. Gutnik (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(3): 402-408.
- Rouse, J. D., D. A. Sabatini et J. M. Sulfito (1994). Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Crit. Rev. Environ. Sc. Technol.*, 24(4): 325-370.
- Roy, D., L. M. Minwen et W. Guang-te (1994). Modeling of anthracene removal from soil columns by surfactant. *J. Environ. Sci. Health, A-29*: 197-213.
- Samson, R. (1994a). *Biorestauration des sites contaminés: 1- Les technologies ex situ*. Cahier technique réalisé pour le Centre québécois de la valorisation de la biomasse (CQVB). Montréal, P. Goulet et D. Jacques (eds), 19 p.
- Samson, R. (1994b). *Biorestauration des sites contaminés: 2- Les technologies in situ*. Cahier technique réalisé pour le Centre québécois de la valorisation de la biomasse (CQVB). Montréal, P. Goulet et D. Jacques (eds), 17 p.
- Samson, R., T. Cseh, J. Hawari, C. W. Greer et R. Zaloum (1990). Biotechnologies appliquées à la restauration de sites contaminés avec exemple d'application d'une technique physico-chimique et biologique pour les sols contaminés par les BPC. *Sciences et Techniques de l'eau*, 23(1): 15-23.
- Schantz, M. M. et S. N. Chesler (1986). Supercritical fluid extraction procedure for the removal of trace organic species from solid samples. *J. Chromatogr.*, 363: 397-401.
- Scheibenbogen, K., R. G. Zytner, H. Lee et J. T. Trevors (1994). Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 59: 53-59.
- Sims, R. C. et M. R. Overcash (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Rev.*, 88: 1-68.
- Sims, R. C., W. J. Doucette, J. E. McLean, W.J. Grenney et R. R. Dupont (1988). *Treatment potential for 56 EPA-listed hazardous chemicals in soil*. R. S. Kerr Environ. Res. Lab., Ada, OK, USA, USEPA report No. 600/6-88/001.
- Smith, J. R., D. V. Nakles, D. F. Sherman, E. F. Neuhauser, R. C. Loehr et D. Erickson (1989). *Environmental fate mechanisms influencing biological degradation of coal-tar derived*

- polynuclear aromatic hydrocarbons in soil systems*. EPA Res. Dev., Pittsburgh, PA, USA, USEPA report No. 600/9-89/072.
- Smith, M. R. (1990). The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*, 1: 191-206.
- Statistical Analysis System Institute, Inc. (1989). *SASSTAT Procedures Guide for Personal computer*. version 6.07, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Stroo, H. F., W. Mahaffey et A. W. Bourquin (1989). Development of an in situ bioremediation system for a creosote-contaminated site. Dans: *Int. Conf. Physiochemical Biol. Detoxif. Hazard. Wastes*, 919-936. Landcaster, PA, 1989.
- Struijs, J. et J. Stoltenkamp (1994). Testing surfactants for ultimate biodegradability. *Chemosphere*, 28: 1503-1523.
- Stucki, G. et M. Alexander (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 292-297.
- Sun, S. et S. A. Boyd (1993). Sorption of nonionic organic compounds in soil-water systems containing petroleum sulfonate-oil surfactants. *Environ. Sci. Technol.*, 27: 1340-1346.
- Syldatk, C., S. Lang et F. Wagner (1985). Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp. DSM 2874 grown on n-alkanes. *Z. Naturforsch. C. Biosci.*, 40: 51-60.
- Sylvestre, P. (1991). Sols contaminés au PCP et à la créosote: caractérisation et potentiel de traitement. Mémoire de Maîtrise. Juin 1991, École Polytechnique de Montréal, 180 p.
- Thai, L. T. et W. J. Maier (1992). Solubilization and biodegradation of octadecane in the presence of two commercial surfactants. Dans: *47th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings*, 167-175. Chelsea, Michigan, 1992.
- Thangamani, S. et G. S. Shreve (1994). Effect of anionic biosurfactants on hexadecane partitioning in multiphase systems. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 1993-2000.
- Thomas, A. O. et J. N. Lester (1993). The microbial remediation of former gasworks sites: a review. *Environ. Technol.*, 14: 1-24.
- Thomas, J. M., J. R. Yordy, J. A. Amador et M. Alexander (1986). Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 290-296.
- Tiehm, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 258-263.
- USEPA (1991). High-priority research on bioremediation. Dans: *Bioremediation Research Needs Workshop*, Summary report. 7 p. Washington, DC, 15-16 avril 1991.
- USEPA (1986). *Test methods for evaluating solid waste volume 1 B: Laboratory manual physical/chemical methods*. Third Edition. Washington, DC, Office of Solid Waste and Emergency Response, SW-846.
- Van Dyke, M. I., S. L. Gulley, H. Lee et J. T. Trevors (1993a). Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. *J. Ind. Microbiol.*, 11: 163-170.
- Van Dyke, M. I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee et J. T. Trevors (1993b). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.*, 39: 1071-1078.
- Van Loosdrecht, M. C. M., J. N. W. Lyklema et A. J. B. Zehndes (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.*, 54(1): 75-87.
- Volkering, F., A. M. Breure, A. Sterkenburg et J. G. van Audel (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 548-552.
- Walter, U., M. Beyer, J. Klein et H. J. Rehm (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 671-676.

- Weissenfels, W. D., H. J. Klewer et J. Langhoff (1992). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particules: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 689-696.
- Weissenfels, W. D., M. Beyer et J. Klein, (1990). Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 479-484.
- West, C. C. et J. H. Harwell (1992). Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 2324-2330.
- White, G. F. et N. J. Russell (1992). Biodegradation of anionic surfactants: a bacterial perspective. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 55: 409-411.
- Wild, S. R. et K. C. Jones (1993). Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 5-12.
- Wilson, S. C. et K. C. Jones (1993). Bioremediation of soil contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.*, 80: 229-249.
- Wolf, D. C., T. H. Dao, H. D. Scott et T. L. Lavy (1989). Influence of sterilization methods on selected soil: microbiological, physical and chemical properties. *J. Environ. Qual.*, 18: 39-44.
- Wright, B. W., C. W. Wright et J. S. Fruchter (1989). Supercritical fluid extraction of coal tar contaminated soil samples. *Energy & Fuels*, 3: 474-480.
- Zajic, J. E. et W. Seffens (1984). Biosurfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 1(2): 87-102.
- Zhang, Y. et R. M. Miller (1994) Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2101-2106.
- Zhang, Y. et R. M. Miller (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3276-3282.

## **ANNEXE A**

### **Description des protocoles expérimentaux**

## A.1 Extraction au Soxhlet

Pour la caractérisation initiale du sol (tableau 3.1) et afin de comparer l'efficacité d'extraction de la méthode en tube avec une méthode standard, les HAP ont été extraits au Soxhlet durant 32 heures avec 300 ml de dichlorométhane. L'extraction a été réalisée sur 20 g de sol préalablement séché au sulfate de sodium, broyé au mortier et transféré dans une cartouche d'extraction en papier nettoyée de toutes traces d'hydrocarbures et recouverte de laine de verre. Notons que les standards de récupération 4-fluorobiphényle et paraterphényle (250  $\mu$ l d'une solution de dichlorométhane contenant 1 g/l de chacun des deux standards; pour obtenir une concentration finale de 10 mg/kg de standard dans 25 ml) avaient été préalablement ajoutés avant l'extraction. L'extrait a ensuite été concentré à l'aide d'un Kuderna-Danish afin de s'assurer qu'aucune perte des composés semi-volatils, tel que le naphthalène, ne se produise. Une fraction du concentré a été nettoyée sur un gel de silice (100-200 mesh dans une colonne de 250 mm x 10 mm d.i.) qui avait été préalablement activé à 105°C durant 16 heures. La fraction d'huiles et de graisses minérales a d'abord été éluée par 35 ml d'hexane et les HAP ont ensuite été élués par 75 ml d'hexane contenant 20% de dichlorométhane. Le pentachlorophénol (PCP) a été élué avec un solvant polaire (35 ml de méthanol). Les HAP et le PCP ont été analysés par GC/MS (procédures décrites à la section 3.9). L'hexane, dans lequel se retrouve la fraction d'huiles et de graisses minérales, a été évaporé en presque totalité à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi, modèle RE120), la faible quantité restante étant évaporée à sec sous jet d'azote. Une quantité connue de fréon (CFC-113) a été ajoutée aux échantillons et la quantité d'huiles et de graisses minérales a été détectée par spectrophotométrie infrarouge (Infrared Spectrophotometer PU 9512, Philips Scientific, Cambridge, UK) en utilisant des cellules de 1 cm (Infrasil Quartz). Deux standards ont été utilisés pour la quantification: il s'agit d'un mélange hexadécane/iso-octane en rapport 1:1 (p/p).

## A.2 Extraction au fluide supercritique

Pour l'extraction des HAP par fluide supercritique (Supercritical Fluid Extractor, Dionex), 10 g de sol humide ont été asséchés au sulfate de sodium, broyés au mortier et enrichis avec les standards de récupération (4-fluorobiphényle et paraterphényle). Le sol a été transféré dans les cartouches d'extraction: le temps d'extraction est de 90 minutes. Le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) est le fluide et les restricteurs de 30  $\mu$ m maintenus à 150°C permettent un flux de 250 ml/min.

Différentes conditions de pression (400, 500 et 600 kPa) et de température d'extraction (60°C, 100°C et 150°C) ont été étudiées. L'ajout de co-solvants (15% (v/v) de méthanol ou de dichlorométhane) a permis de vérifier si la présence de ceux-ci améliore le rendement d'extraction. La récupération des HAP extraits a été effectuée dans les vials collecteurs contenant 20 ml de dichlorométhane. Il est à noter que le solvant a été maintenu à une température de 0-2°C durant l'extraction. Une fois les HAP récupérés, le volume de la phase organique (dichlorométhane) a été ajusté afin d'obtenir un volume connu et précis, et les HAP ont ensuite été analysés par GC/MS (voir section 3.9). Pour chaque expérience, un seul échantillon a été effectué.

### **A.3 Analyse des métaux Cu, Cr et As**

L'analyse des métaux présents dans le sol contaminé a été effectuée par un laboratoire certifié (Novalab, Lachine). La concentration des métaux lourds a été déterminée par spectrophotométrie d'émission au plasma.

### **A.4 pH**

Le pH du sol a été déterminé à partir d'une suspension de 5 g de sol humide dans 5 ml d'eau déminéralisée placés dans un tube de verre de 50 ml. Le mélange a été agité durant 1 minute à l'aide d'un vortex, puis centrifugé à 3000 rpm (IEC Centra 4) durant 10 minutes. Le pH du surnageant a été mesuré à l'aide d'un pH mètre (pH meter, model 815, Fisher Scientific, Montréal, Qué.).

### **A.5 Hétérotrophes totaux**

Dans des tubes de verre à bouchon vissés de cinquante millilitres, 50 ml d'une solution saline (NaCl) 0,85% (p/v) ont été ajoutés avec 2,5 g de billes de verre (3 mm). Le contenu a été stérilisé à l'autoclave (20 minutes à 121°C, sous 103,4 kPa). Cinq grammes de sol humide ont été ajoutés sous des conditions aseptiques dans chacun des tubes: le mélange a ensuite été agité au vortex durant 3 minutes. Le surnageant a été décanté puis homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique lors du prélèvement de la quantité nécessaire de liquide pour effectuer les

dilutions suivantes:  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$ . Les bactéries contenues dans chacune des dilutions ont été étalées sur des géloses composées de 1,5% (p/v) d'agar et de 250 mg/l de chacun des nutriments suivants: bactotryptone, extrait de levure et féculé de pomme de terre. Les géloses ont ensuite été incubées à 25°C. Les colonies formées sont comptées au cours du temps jusqu'à ce que leur nombre demeure constant (environ 13 jours).

## A.6 Contenu en eau

Environ dix grammes de sol humide ont été placés dans des cupules d'aluminium préalablement pesées sur une balance analytique. Le poids exact de la cupule contenant le sol est alors pris en note. Les échantillons ont été séchés au four à 105°C durant 24 heures puis placés au dessiccateur durant environ une demi-heure. Les échantillons séchés ont ensuite été pesés rapidement afin d'éviter que ceux-ci captent de l'humidité. Le contenu en eau (%) des échantillons est alors calculé de la façon suivante:

$$\text{contenu en eau} = \frac{[(\text{g sol humide} - \text{g cupule}) - (\text{g sol sec} - \text{g cupule})]}{(\text{g sol humide} - \text{g cupule})} \times 100$$

## A.7 Extraction et analyse des ions solubles

Vingt cinq millilitres d'une solution de KCl (2 g/l) faiblement préparée ont été ajoutés à 10 g de sol humide dans un tube de plastique à bouchon vissé de 50 ml. Le mélange a été agité pendant une heure (agitateur Wrist Action, Burrell modèle 75) puis centrifugé à 3000 rpm (centrifugeuse IEC) pendant 10 minutes. Le surnageant (2 ml) a ensuite été filtré sur une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millex-HV, Millipore). L'analyse des cations a été effectuée à l'aide d'un chromatographe à haute performance en phase liquide (HPLC, Spectra-Physics, modèle SP8100) muni d'un détecteur à conductivité (Waters, modèle 430) et d'une colonne (Hamilton PRP-X200, 250 mm x 41 mm) utilisant une phase mobile composée de 35% de méthanol dans l'acide nitrique 6 mM. Pour l'analyse des anions, une colonne Hamilton PRP-X100 de 250 mm x 41 mm a été utilisée. Dans ce cas, la phase mobile (pH ajusté à 8,5) est composée de 10% de méthanol dans l'acide para-hydroxybenzoïque 7 mM.

## **A.8 Rapport C/N**

Le rapport carbone/azote a été obtenu à l'aide d'un analyseur élémentaire (CHN, modèle 240XA, Control Equipment Corp). Un échantillon de sol, préalablement séché à l'air pour éviter la transformation des ions ammonium, a été pesé (20-30 mg) puis placé dans des coupelles pour subir une combustion en présence d'un catalyseur, à une température d'environ 1000°C. Les gaz produits sont détectés. Les résultats expriment le rapport du carbone total (incluant la créosote) sur l'azote total.

## **A.9 Contenu en matières organiques**

Environ dix grammes de sol humide (masse précise connue) ont été placés dans des creusets préalablement pesés sur une balance analytique. Le poids exact des creusets contenant le sol est alors pris en note. Le sol a été placé au four à 105°C durant 24 heures. Les creusets ont ensuite été déposés dans un dessiccateur pour 1 heure. Les échantillons ont d'abord été pesés pour obtenir le contenu en eau, puis placés au four à 600°C durant une heure. Les échantillons ont été remis au dessiccateur pour un minimum d'une heure puis repesés pour obtenir le contenu en matières organiques.

## **A.10 Analyse granulométrique**

L'analyse a été réalisée selon la méthode proposée par Gee et Bauder (1986). Les déterminations ont été effectuées en 3 répétitions. Un échantillon de 60 g de sol a été déposé dans un bécher de plastique de un litre contenant 250 ml d'eau et 100 ml d'une solution de métaphosphate de sodium 5% (p/v). Le bécher a été recouvert d'un papier parafilm, agité légèrement et laissé au repos durant une nuit à la température ambiante. Le sol a ensuite été mélangé durant 5 minutes à l'aide d'un batteur rotatif (Brookfield) à intensité 40. La suspension a été transférée dans trois cylindres à sédimentation de un litre et le volume a été complété à un litre avec de l'eau déminéralisée à une température de 22-23°C. Dans un quatrième cylindre, un témoin sans sol a été réalisé avec 100 ml de la solution de métaphosphate de sodium ajusté à un litre avec de l'eau déminéralisée.

La vitesse de sédimentation des particules a été déterminée à l'aide d'un hydromètre ASTM 152H. Les mélanges ont été agités par inversion des cylindres à sédimentation. Les mesures

avec l'hydromètre ainsi que la mesure de la température ont été effectuées aux temps suivants: 30 secondes, 1 minute, 3 minutes, 10 minutes, 30 minutes, 1 heure, 1 heure 30 minutes, 2 heures et 24 heures. Les mesures ont été prises avec précaution et sans remous afin de ne pas modifier la sédimentation des particules (l'hydromètre a été retiré après chaque mesure). Après la dernière mesure à 24 heures, chaque échantillon a été tamisé à 2 mm et puis à 53  $\mu\text{m}$ . L'échantillon recueilli sur le tamis de 53  $\mu\text{m}$  a été soigneusement rincé avec un jet d'eau déionisée pour éliminer le limon et l'argile. Les tamis ont ensuite été séchés durant la nuit à 105°C, mis au dessiccateur et pesés. La fraction de sol recueillie sur le tamis de 53  $\mu\text{m}$  représente la portion du sol qui est composée en sable (53  $\mu\text{m}$  < particules de sable < 2 mm). Les contenus en limon (2  $\mu\text{m}$  < particules < 53  $\mu\text{m}$ ) et en argile (particules < 2  $\mu\text{m}$ ) sont déterminés par les mesures de la vitesse de sédimentation des particules.

### **A.11 Détermination de la capacité au champ**

Une membrane de cellulose a été immergée avec précaution dans de l'eau déminéralisée afin de l'humidifier et de très bien l'assouplir. Celle-ci a ensuite été déposée et centrée sur le grillage de l'appareil (Pressure membrane extractor, model 1000, SoilMoisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA). Un anneau d'étanchéité a été posé sur la membrane cellulosique en s'assurant qu'aucune particule de sol ne se trouvait sous l'anneau. Le cylindre extérieur de l'appareil a été installé de façon à ce que l'anneau d'étanchéité soit logé dans le sillon inférieur du cylindre et que les fentes et les vis excentriques soient bien alignées. Des duplicata de 25 g de sol tamisés à 2 mm ont été placés dans les cylindres appropriés et déposés sur la membrane cellulosique. Ces cylindres, recouverts de carrés de papier ciré, ont été laissés au moins 16 heures avec un surplus d'eau à la surface de la membrane. Après avoir enlevé le surplus d'eau (l'eau est aspirée par une pipette de verre), l'appareil a ensuite été fermé et une pression de 30 kPa a alors été appliquée. La lecture périodique du niveau d'eau dans la burette a été effectuée afin de connaître le moment où l'équilibre a été atteint (arrêt des fluctuations de niveau). À ce moment, une pression différentielle a ensuite été appliquée afin de permettre au diaphragme d'exercer une légère pression sur le sol et de garder celui-ci en contact avec la membrane cellulosique jusqu'à la fin de l'extraction. Lorsque l'équilibre est atteint une seconde fois, les échantillons sont prélevés et la détermination du contenu en eau de ceux-ci est alors effectuée. Le temps requis pour atteindre l'équilibre est généralement de 18 à 48 heures.

## **A.12 Production des surfactants biologiques de *P. aeruginosa* UG2**

### **A.12.1 Préparation de l'inoculum des bactéries (*P. aeruginosa* UG2)**

Les souches bactériennes telles que reçues (congelées) ont été décongelées sur la glace et mises dans du milieu nutritif "Nutrient Broth" (extrait de boeuf (3 g/l) et bactopectone (5 g/l)) pour une croissance d'une nuit à 25°C sous une agitation de 200 rpm (planaire). La culture a été mise en aliquots de 700 µl dans de petits tubes de 1,5 ml. Une même quantité de glycérol à 25% (p/v) a été ajoutée (700 µl) pour obtenir une concentration finale en glycérol de 12,5% (p/v). Les souches ont été conservées à - 80°C jusqu'à utilisation. Lorsqu'une production de surfactants était amorcée, un échantillon de la suspension décongelée a été inoculée sur une gélose (milieu nutritif "Nutrient Broth") et incubée à 25°C pour une nuit. Ensuite, une colonie était prélevée à l'aide d'un manche à boucle et inoculée en milieu liquide (milieu nutritif "Nutrient Broth") pour une croissance d'une nuit (agitation de type planaire de 200 rpm, 25°C). Cette dernière manipulation permet de s'assurer de l'obtention d'une culture pure.

### **A.12.2 Production et purification des surfactants biologiques**

Les protocoles utilisés ont été décrits par Jain et al. (1992) et Van Dyke et al. (1993b). Dans des fioles coniques de 1 litre, environ 1 ml/l de la suspension bactérienne de *P. aeruginosa* UG2 (croissance d'une nuit (voir section A.12.1)) a été inoculé dans 200 ml du milieu de culture (pH 7) suivant (g/l): glucose: 20; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,65; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,17; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0,1; NaNO<sub>3</sub>: 0,5; NaCl: 0,5; FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O: 0.01 M; CaCl<sub>2</sub>: 0,02 M et 1 ml/l de milieu de culture d'une solution de métaux traces afin d'obtenir les concentrations finales suivantes (µM): Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 1; Alk(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O: 1; CuSO<sub>4</sub>: 1; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: 1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 10; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: 10, et: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O: 2. Les fioles coniques ont été fermées avec un bouchon mousse pour permettre une présence continue d'oxygène et la culture a été incubée à 28°C à 200 rpm (agitateur planaire) durant environ 21 jours. Après ce temps, la culture a été centrifugée (pour séparer le liquide des bactéries) à 5000 rpm durant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré dans un récipient et les surfactants ont été précipités par ajout d'acide chlorhydrique 5 M (obtention d'un pH de 2, repos de 24 heures à 4°C). Un précipité blanc est alors obtenu. Le milieu a été centrifugé à 5000 rpm durant 45 minutes à 4°C et le surnageant a été jeté. Le culot a été lavé trois fois avec de l'eau distillée et celui-ci, contenant les agents tensioactifs biologiques,

a été placé au congélateur à -20°C pour la nuit. Le lendemain, le précipité a été lyophilisé et conservé dans un dessiccateur à la température de la pièce jusqu'à son utilisation.

### **A.12.3 Suivi du glucose, de la tension de surface et de la densité optique durant la production**

Lors de la production des surfactants biologiques, le suivi de la tension de surface, la détermination de la dilution pour atteindre la CMC ainsi que le suivi de la disparition du glucose et de l'évolution de la densité optique (pour le suivi de la quantité de bactéries) ont été effectués (voir chapitre 4). Pour cette expérience, deux réplicats ont été effectués. À intervalles réguliers, environ 4 ml de la culture de *P. aeruginosa* UG2 ont été échantillonnés et déposés dans des tubes de verre pouvant être placés dans un spectrophotomètre UV-visible. La densité optique a alors été déterminée à une longueur d'onde de 600 nm. Pour déterminer la concentration de glucose, le milieu de culture (4 ml) a été filtré sur 0,45  $\mu\text{m}$  (Millex-HV, Millipore) et une fraction a été placée dans des petits tubes pour l'analyse avec un appareil HPLC. La fraction restante du filtrat a été utilisée pour la détermination de la tension de surface et du facteur de dilution correspondant à la CMC (voir section 3.4.1).

## **ANNEXE B**

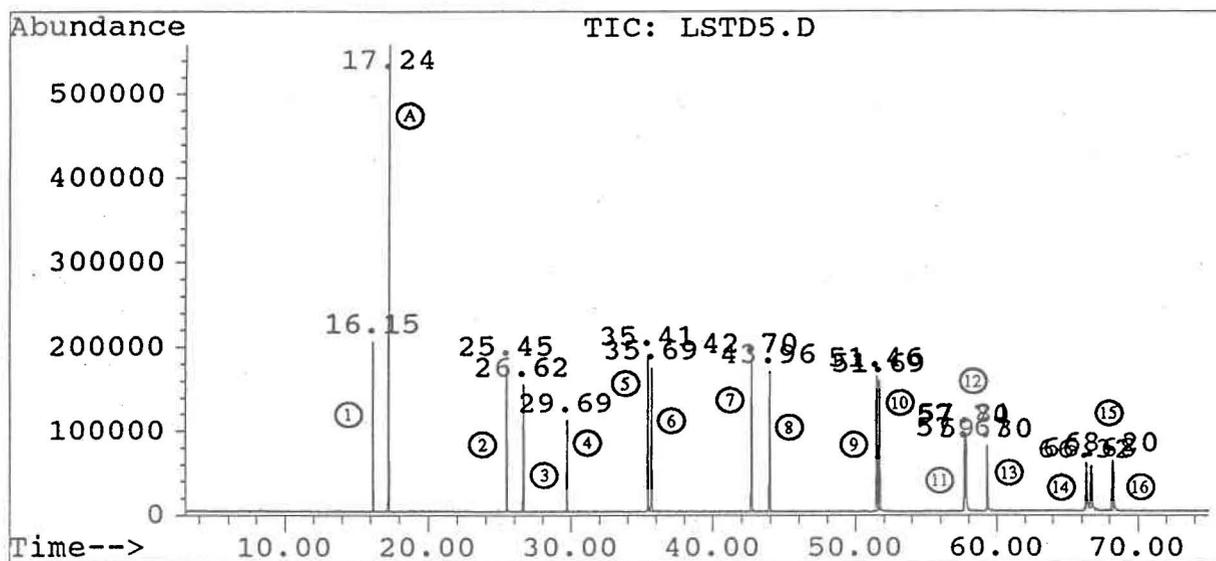
### **Chromatogrammes typiques et calcul des concentrations de HAP**

## B.1 Standards de HAP

L'expérience portant sur la biodégradation des HAP en présence et en absence d'agents tensioactifs (chapitre 7) a nécessité de très nombreuses extractions et analyses de HAP afin de pouvoir déterminer les concentrations résiduelles de chacun des contaminants étudiés dans le sol. Pour chacune des semaines pour lesquelles l'extraction des HAP a été effectuée, les 24 microcosmes ont été échantillonnés, les HAP ont été extraits du sol et les concentrations en HAP ont été déterminées par analyse sur GC/MS (section 3.8.2). À chacune de ces analyses, des standards de HAP ainsi que des standards de récupération ont également été analysés afin de permettre le calcul des concentrations. Les figures suivantes présentent des chromatogrammes typiques de chacun.

Pour chacune des analyses effectuées, des standards de HAP contenant les 16 HAP prioritaires (USEPA) ont été utilisés. Ces derniers ont servi à la réalisation de la courbe étalon à partir de laquelle les concentrations de HAP dans le sol ont été calculées. La figure B.1 présente les chromatogrammes des standards de HAP à deux différentes concentrations (5 et 50 mg/l). Chacun des pics est numéroté et peut être identifié à l'aide du tableau B.1 présenté à la suite. Dans chacun des chromatogrammes, on retrouve également le pic correspondant à la présence du 1,2,3-trichlorobenzène (temps de rétention: 17,24 minutes), le standard d'injection. Pour chacune des analyses, ce pic a servi à vérifier la constance de lecture entre les échantillons.

A



B

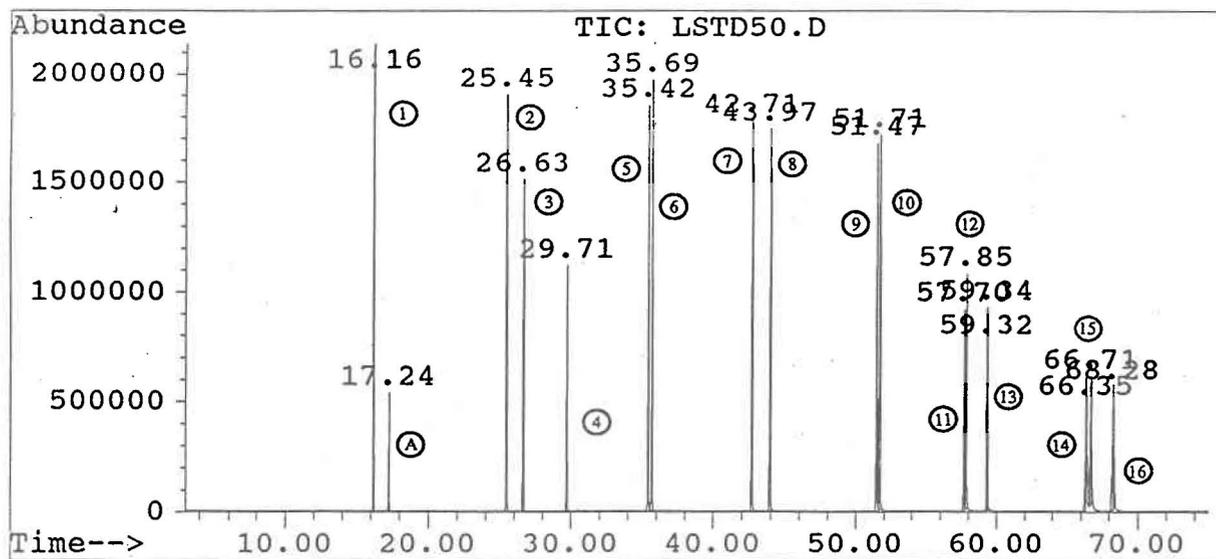


Figure B.1: Chromatogrammes des standards de HAP à: A) 5 mg/l et B) 50 mg/l.

Dans un standard donné, tous les HAP se retrouvent à la même concentration. Dépendamment des concentrations retrouvées dans le sol pour chacun des HAP et de la semaine à laquelle il y a eu échantillonnage, différentes concentrations de standard ont été utilisées. En général, les concentrations suivantes ont été employées: 0,1, 0,5, 2, 5, 20 et 50 mg/l. Chacun des HAP possède un temps de rétention différent sur la colonne (section 3.9). Le tableau B.1 présente, pour chacun des 16 HAP, leur temps de rétention respectif.

Tableau B.1: Temps de rétention pour chacun des 16 HAP prioritaires

pic #	HAP	Temps de rétention (minutes)
1	naphtalène	16,156
2	acénaphthylène	25,452
3	acénaphthène	26,622
4	fluorène	29,702
5	phénanthrène	35,413
6	anthracène	35,685
7	fluoranthène	42,699
8	pyrène	43,959
9	benzo(a)anthracène	51,465
10	chrysène	51,689
11	benzo(b)fluoranthène	57,694
12	benzo(k)fluoranthène	57,819
13	benzo(a)pyrène	59,322
14	indéno(1,2,3-cd)pyrène	66,347
15	dibenzo(a,h)anthracène	66,682
16	benzo(g,h,i)pérylène	68,204

## B.2 Standards de récupération

À chacun des échantillons de sol à analyser, des standards de récupération ont été ajoutés, soit le 4-fluorobiphényle et le paraterphényle (section 3.8.2). Ces standards ont servi à corriger les concentrations de HAP en fonction du pourcentage de récupération obtenu à chacune des extractions. La figure B.2 présente un chromatogramme typique de ces deux standards de récupération ainsi que celui du standard d'injection (1,2,3-trichlorobenzène).

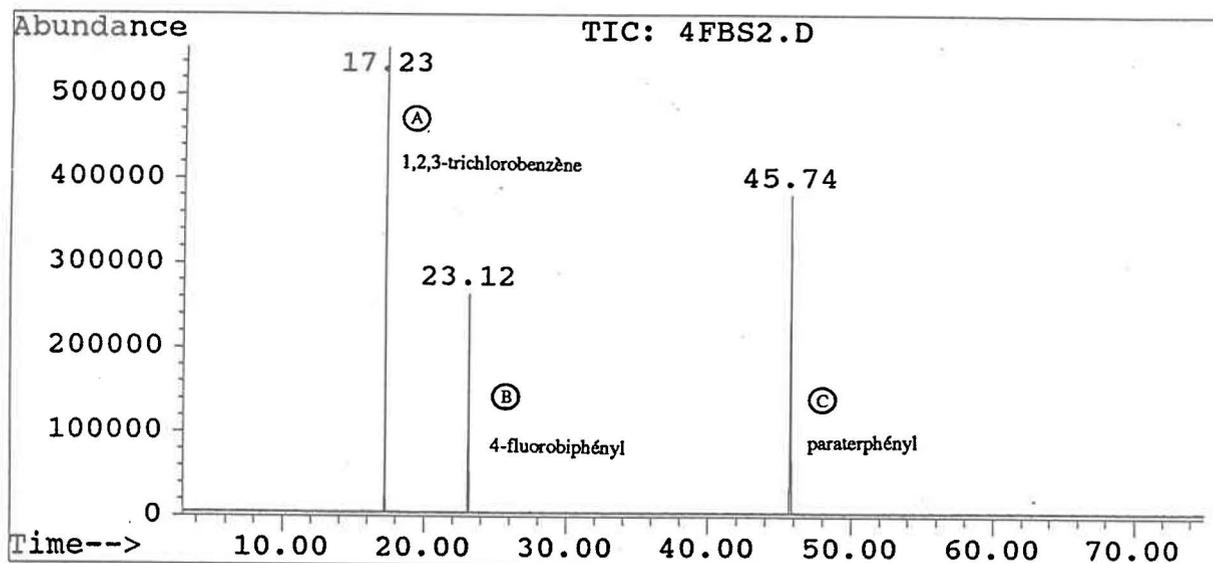


Figure B.2: Chromatogramme typique des standards de récupération et du standard d'injection.

Les temps de rétention obtenus pour le 4-fluorobiphényle et le paraterphényle sont respectivement de 23,124 et 45,743 minutes.

## B.3 Échantillon de sol

La figure B.3 présente un chromatogramme typique des HAP extraits d'un échantillon de sol utilisé dans l'expérience de biodégradation des HAP (chapitre 7). Les HAP ont été extraits par la méthode en tubes décrite à la section 3.8.2 (Matériel et Méthodes). On y retrouve les pics correspondant aux HAP présents dans le sol. Les pics correspondant à la présence des

standards 1,2,3-trichlorobenzène (pic A), 4-fluorobiphényle (pic B) et paraterphényle (pic C) y sont également présents.

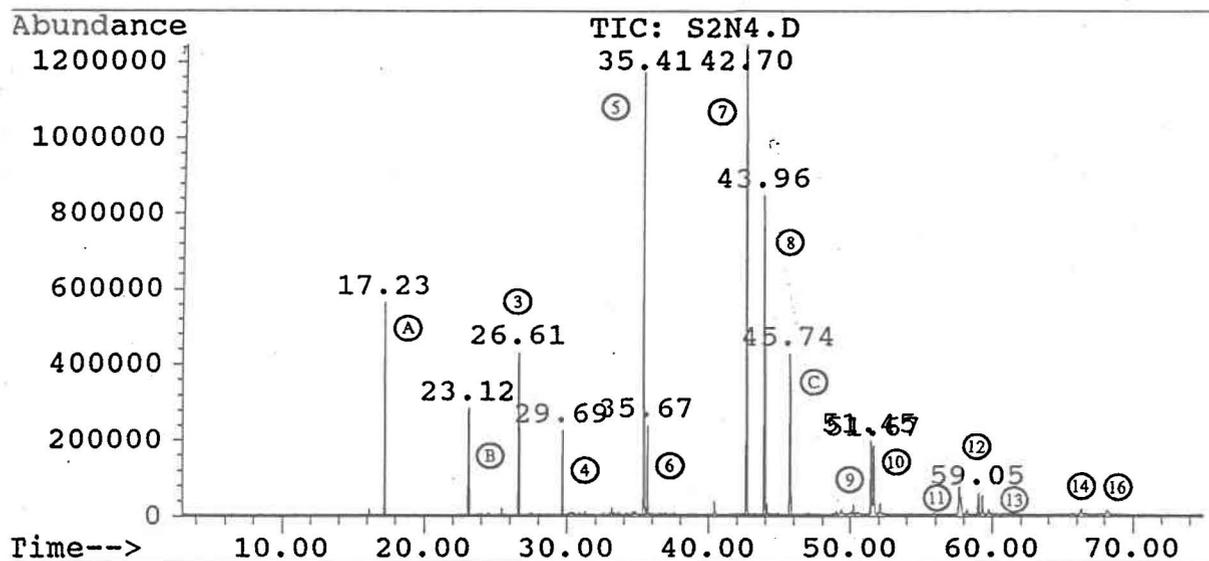


Figure B.3: Chromatogramme typique des HAP extraits d'un échantillon du sol contaminé à la créosote.

## B.4 Méthode de calcul des concentrations de HAP

La concentration des HAP retrouvés dans les échantillons de sol (expérience de biodégradation, chapitre 7) ou en milieu aqueux (expérience de mobilisation, chapitre 6) a été obtenue à l'aide des calculs suivants:

### 1- Tracé de la courbe étalon à l'aide des standards de HAP

Pour chacun des HAP étudiés, une courbe présentant l'aire du pic en ordonnée en fonction de la concentration en HAP en abscisse est effectuée à l'aide des standard de HAP (figure B.4). À partir de ce graphique et des aires obtenues sous les pics (figure B.3) pour les HAP extraits des échantillons de sol ou d'eau, une concentration en HAP peut être alors déterminée.

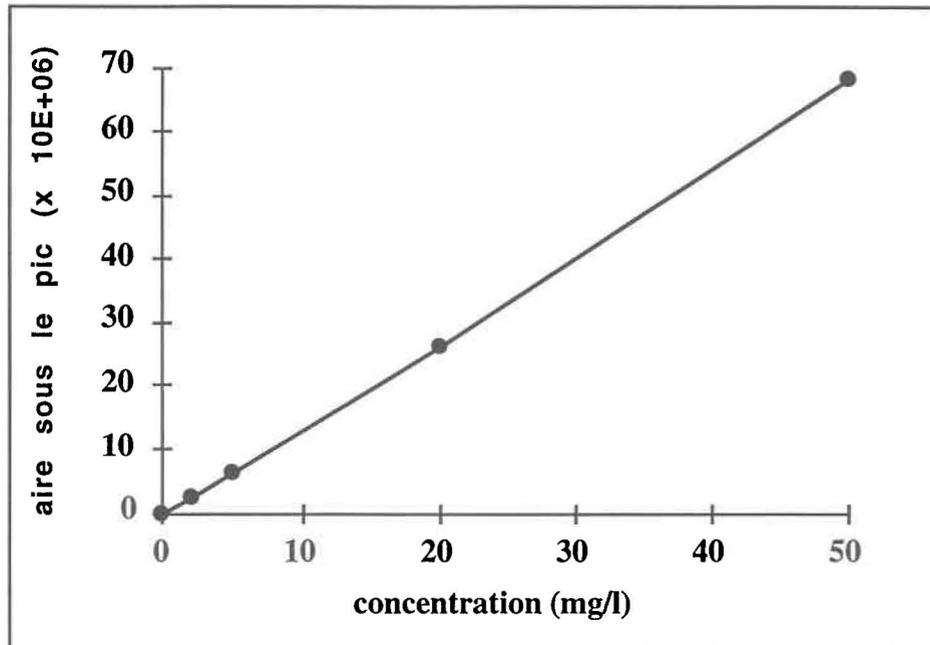


Figure B.4: Courbe étalon du phénanthrène.

Par exemple, une aire de 42 457 703 a été obtenue pour le phénanthrène dans l'échantillon de sol (figure B.3). Cette aire correspond, selon la courbe étalon, à une concentration en phénanthrène de 31 mg/l dans l'extrait.

## 2- Concentration sur la base du poids sec de sol

Chacune des concentrations de HAP dans le sol a été calculée sur une base de poids sec. Par exemple, pour l'échantillon présenté ci-haut, 8,83 g de sol ont servi à l'extraction. Cependant, comme le sol possédait un contenu en eau de 16%, le sol extrait correspond donc à un poids sec de 7,42 g.

Puisque les HAP ont été extraits avec 20 ml de dichlorométhane et qu'avant l'analyse une dilution 1/10 a été effectuée, on obtient:

$$\frac{31 \text{ mg/l} \times 0,0201 \times 10}{0,00742 \text{ kg}} = 836 \text{ mg/kg de phénanthrène}$$

### 3- Correction pour le 4-fluorobiphényle et le paraterphényle

Dans le cas présent, un pourcentage de récupération de 109% a été déterminé pour les deux standards de récupération. La concentration en phénanthrène est alors corrigée pour le rendement d'extraction. On obtient ainsi:

$$\frac{836 \text{ mg/kg} \times 100}{109} = 767 \text{ mg/kg}$$

Notons que des rendements de récupération très satisfaisants, entre de 90 et 110%, ont toujours été obtenus. Des valeurs plus élevées que 100% de récupération peuvent s'expliquer en partie par une évaporation de l'échantillon ayant pour effet de concentrer l'extrait.

**ANNEXE C**  
**Résultats bruts**

### C.1 Résultats bruts du chapitre 3

Les trois prochains tableaux présentent les résultats de caractérisation obtenus pour les autres sols qui n'ont pas été sélectionnés suite à leur trop faible contamination en HAP (voir section 3.1).

Tableau C.1: Caractérisation chimique du sol provenant d'un site industriel d'entreposage de pétrole (Montréal, sol échantillonné en septembre 1992)

Contaminants	Concentration (mg/kg)	Critères de la contamination des sols (MENVIQ 1988) (mg/kg)		
		A	B	C
<b>2 anneaux</b>				
naphtalène	2	<0,1	5	50
<b>3 anneaux</b>				
acénaphthylène	0	<0,1	10	100
acénaphthène	0	<0,1	10	100
fluorène	2	<0,1	10	100
phénanthrène	7	<0,1	5	50
anthracène	23	<0,1	10	100
<b>4 anneaux</b>				
fluoranthène	16	<0,1	10	100
pyrène	12	<0,1	10	100
benzo(a)anthracène	7	<0,1	1	10
chrysène	8	<0,1	1	10
<b>5 anneaux</b>				
benzo(b)fluoranthène	15	<0,1	1	10
benzo(k)fluoranthène	7	<0,1	1	10
benzo(a)pyrène	11	<0,1	1	10
dibenzo(a,h)anthracène	0	<0,1	1	10
<b>6 anneaux</b>				
indéno(1,2,3-cd)pyrène	6	<0,1	1	10
benzo(g,h,i)pérylène	5	<0,1	1	10
total des HAP	121	1	20	200

Tableau C.2: Caractérisation chimique du sol provenant d'un site industriel de traitement du bois  
(sol entreposé en pile à Delson échantillonné le 30 octobre 1992)

Contaminants	Concentration (mg/kg)	Critères de la contamination des sols (MENVIQ 1988) (mg/kg)		
		A	B	C
<b>2 anneaux</b>				
naphthalène	21	<0,1	5	50
<b>3 anneaux</b>				
acénaphthylène	2	<0,1	10	100
acénaphthène	3	<0,1	10	100
fluorène	9	<0,1	10	100
phénanthrène	31	<0,1	5	50
anthracène	65	<0,1	10	100
<b>4 anneaux</b>				
fluoranthène	60	<0,1	10	100
pyrène	117	<0,1	10	100
benzo(a)anthracène	22	<0,1	1	10
chrysène	43	<0,1	1	10
<b>5 anneaux</b>				
benzo(b)fluoranthène	59	<0,1	1	10
benzo(k)fluoranthène	37	<0,1	1	10
benzo(a)pyrène	50	<0,1	1	10
dibenzo(a,h)anthracène	8	<0,1	1	10
<b>6 anneaux</b>				
indéno(1,2,3-cd)pyrène	40	<0,1	1	10
benzo(g,h,i)pérylène	36	<0,1	1	10
total des HAP	603	1	20	200

Tableau C.3: Caractérisation chimique du sol provenant d'un site industriel d'entreposage de pétrole (Montréal, sol obtenu en mars 1993)

Contaminants	Concentration (mg/kg)	Critères de la contamination des sols (MENVIQ 1988) (mg/kg)		
		A	B	C
<b>2 anneaux</b>				
naphthalène	0	<0,1	5	50
<b>3 anneaux</b>				
acénaphthylène	0	<0,1	10	100
acénaphthène	0	<0,1	10	100
fluorène	3	<0,1	10	100
phénanthrène	7	<0,1	5	50
anthracène	0	<0,1	10	100
<b>4 anneaux</b>				
fluoranthène	0	<0,1	10	100
pyrène	3	<0,1	10	100
benzo(a)anthracène	1	<0,1	1	10
chrysène	1	<0,1	1	10
<b>5 anneaux</b>				
benzo(b)fluoranthène	0	<0,1	1	10
benzo(k)fluoranthène	0	<0,1	1	10
benzo(a)pyrène	0	<0,1	1	10
dibenzo(a,h)anthracène	0	<0,1	1	10
<b>6 anneaux</b>				
indéno(1,2,3-cd)pyrène	0	<0,1	1	10
benzo(g,h,i)pérylène	0	<0,1	1	10
total des HAP	15	1	20	200

## C.2 Résultats bruts du chapitre 5

Les tableaux C.4 à C.9 présentent les résultats bruts des figures 5.1, 5.2 et 5.3.

Tableau C.4: Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE (pression de 400 kPa) pour différentes conditions de température.

HAP	Récupération (%)		
	60 °C	100 °C	150 °C
<b>2 anneaux</b>			
naphthalène	46	123	135
<b>3 anneaux</b>			
acénaphthylène	ND(a)	ND	ND
acénaphthène	ND	ND	ND
fluorène	23	35	99
phénanthrène	23	37	93
anthracène	23	34	96
<b>4 anneaux</b>			
fluoranthène	37	56	58
pyrène	46	57	76
benzo(a)anthracène	43	53	86
chrysène	46	58	86
<b>5 anneaux</b>			
benzo(b)fluoranthène	54	73	112
benzo(k)fluoranthène	39	68	118
benzo(a)pyrène	42	60	103
dibenzo(a,h)anthracène	27	45	99
<b>6 anneaux</b>			
indéno(1,2,3-cd)pyrène	22	42	81
benzo(g,h,i)pérylène	21	34	64

(a) ND: non détecté

Tableau C.5: Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE (pression de 500 kPa) pour différentes conditions de température.

HAP	Récupération (%)		
	60 °C	100 °C	150 °C
<b>2 anneaux</b>			
naphtalène	57	132	114
<b>3 anneaux</b>			
acénaphthylène	ND(a)	ND	ND
acénaphthène	ND	ND	ND
fluorène	57	54	129
phénanthrène	41	52	133
anthracène	63	65	147
<b>4 anneaux</b>			
fluoranthène	31	58	58
pyrène	40	62	70
benzo(a)anthracène	46	55	78
chrysène	51	65	84
<b>5 anneaux</b>			
benzo(b)fluoranthène	56	88	127
benzo(k)fluoranthène	61	61	92
benzo(a)pyrène	54	74	105
dibenzo(a,h)anthracène	65	104	102
<b>6 anneaux</b>			
indéno(1,2,3-cd)pyrène	43	65	105
benzo(g,h,i)pérylène	30	56	83

(a) ND: non détecté

Tableau C.6: Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE (pression de 600 kPa) pour différentes conditions de température.

HAP	Récupération (%)		
	60 °C	100 °C	150 °C
<b>2 anneaux</b>			
naphtalène	57	121	131
<b>3 anneaux</b>			
acénaphthylène	ND(a)	ND	ND
acénaphthène	ND	ND	ND
fluorène	51	133	36
phénanthrène	46	166	50
anthracène	54	136	33
<b>4 anneaux</b>			
fluoranthène	49	97	67
pyrène	61	84	68
benzo(a)anthracène	57	89	86
chrysène	58	88	89
<b>5 anneaux</b>			
benzo(b)fluoranthène	55	103	106
benzo(k)fluoranthène	52	61	104
benzo(a)pyrène	51	79	104
dibenzo(a,h)anthracène	38	62	105
<b>6 anneaux</b>			
indéno(1,2,3-cd)pyrène	41	96	156
benzo(g,h,i)pérylène	33	58	104

(a) ND: non détecté

Tableau C.7: Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE en utilisant différents co-solvants (température de 100°C, pression de 400 kPa).

HAP	Récupération (%)		
	sans co-solvant	15% MeOH	15% MeCl <sub>2</sub>
<b>2 anneaux</b>			
naphthalène	123	156	185
<b>3 anneaux</b>			
acénaphthylène	ND(a)	ND	ND
acénaphthène	ND	ND	ND
fluorène	35	116	115
phénanthrène	37	105	104
anthracène	34	104	103
<b>4 anneaux</b>			
fluoranthène	56	77	81
pyrène	57	66	91
benzo(a)anthracène	53	68	73
chrysène	58	92	79
<b>5 anneaux</b>			
benzo(b)fluoranthène	73	88	91
benzo(k)fluoranthène	68	62	71
benzo(a)pyrène	60	67	69
dibenzo(a,h)anthracène	45	38	49
<b>6 anneaux</b>			
indéno(1,2,3-cd)pyrène	42	41	43
benzo(g,h,i)pérylène	34	38	35

(a) ND: non détecté

Tableau C.8: Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE en utilisant différents co-solvants (température de 100°C, pression de 500 kPa).

HAP	Récupération (%)		
	sans co-solvant	15% MeOH	15% MeCl <sub>2</sub>
<b>2 anneaux</b>			
naphtalène	132	128	141
<b>3 anneaux</b>			
acénaphthylène	ND(a)	ND	ND
acénaphthène	ND	ND	ND
fluorène	54	33	32
phénanthrène	52	34	35
anthracène	65	29	24
<b>4 anneaux</b>			
fluoranthène	58	63	71
pyrène	62	64	81
benzo(a)anthracène	55	66	70
chrysène	65	74	75
<b>5 anneaux</b>			
benzo(b)fluoranthène	88	86	85
benzo(k)fluoranthène	61	77	26
benzo(a)pyrène	74	77	56
dibenzo(a,h)anthracène	104	94	49
<b>6 anneaux</b>			
indéno(1,2,3-cd)pyrène	65	65	51
benzo(g,h,i)pérylène	56	56	39

(a) ND: non détecté

Tableau C.9: Pourcentage de récupération (par rapport au Soxhlet) des 16 HAP prioritaires contenus dans un sol contaminé obtenu par la méthode SFE en utilisant différents co-solvants (température de 100°C, pression de 600 kPa).

HAP	Récupération (%)		
	sans co-solvant	15% MeOH	15% MeCl <sub>2</sub>
<b>2 anneaux</b>			
naphtalène	121	91	72
<b>3 anneaux</b>			
acénaphthylène	ND(a)	ND	ND
acénaphthène	ND	ND	ND
fluorène	133	75	31
phénanthrène	166	65	29
anthracène	136	65	49
<b>4 anneaux</b>			
fluoranthène	97	65	57
pyrène	84	87	70
benzo(a)anthracène	89	86	70
chrysène	88	85	70
<b>5 anneaux</b>			
benzo(b)fluoranthène	103	91	87
benzo(k)fluoranthène	61	98	52
benzo(a)pyrène	79	84	64
dibenzo(a,h)anthracène	62	65	80
<b>6 anneaux</b>			
indéno(1,2,3-cd)pyrène	96	61	53
benzo(g,h,i)pérylène	58	55	44

(a) ND: non détecté

### C.3 Résultats bruts du chapitre 7

Les tableaux C.10 à C.22 présentent les résultats bruts des figures 7.5 et 7.6.

Tableau C.10: Concentrations résiduelles du fluorène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)									
	semaine 0	semaine 2	semaine 4	semaine 6	semaine 7	semaine 11	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	238	53	54	22	7	1	18	9	5	9
sans surfactant	244	29	52	20	10	1	0	8	6	10
sans surfactant	248	72	66	35	16	1	0	9	19	10
500 µg/g bio.	252	65	64	27	11	1	0	13	5	9
500 µg/g bio.	249	39	49	14	8	1	0	9	5	8
500 µg/g bio.	221	48	54	24	24	8	17	19	5	10
100 µg/g bio.	240	64	57	26	10	1	0	15	5	10
100 µg/g bio.	232	107	87	35	26	9	18	9	5	10
100 µg/g bio.	227	47	60	22	7	1	0	15	16	10
10 µg/g bio.	223	52	63	23	22	1	17	20	12	9
10 µg/g bio.	255	48	63	21	11	1	19	15	5	10
10 µg/g bio.	241	56	48	23	10	1	0	10	5	9
500 µg/g SDS	225	90	84	33	11	1	18	18	5	11
500 µg/g SDS	225	88	70	26	23	1	0	16	5	13
500 µg/g SDS	226	174	141	64	45	14	24	22	5	13
100 µg/g SDS	229	114	92	37	29	12	24	18	5	8
100 µg/g SDS	227	62	74	23	25	7	31	9	5	8
100 µg/g SDS	224	85	81	24	12	13	22	16	5	8
10 µg/g SDS	228	39	48	21	12	1	0	9	5	10
10 µg/g SDS	226	51	59	23	8	1	0	16	5	9
10 µg/g SDS	221	111	80	30	31	10	22	18	5	8
témoin (sans)	254	229	278		217	160	205	203	245	135
témoin (bio)	221	243	275	283	210	165	224	206	213	146
témoin (SDS)	228	255	276	269	225	181	222	218	214	160

Tableau C.11: Concentrations résiduelles du phénanthrène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)									
	semaine 0	semaine 2	semaine 4	semaine 6	semaine 7	semaine 11	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	754	151	119	44	34	18	36	29	21	10
sans surfactant	739	77	84	42	28	11	24	23	8	11
sans surfactant	731	207	146	72	55	22	30	34	35	13
500 µg/g bio.	793	183	140	65	40	21	33	34	20	14
500 µg/g bio.	758	117	73	33	35	12	25	31	18	10
500 µg/g bio.	703	137	106	42	51	26	38	48	23	15
100 µg/g bio.	720	208	129	67	38	21	31	32	17	16
100 µg/g bio.	704	250	196	69	52	28	34	34	20	16
100 µg/g bio.	718	153	124	49	27	20	30	33	43	15
10 µg/g bio.	704	165	140	46	40	21	33	42	24	12
10 µg/g bio.	798	146	127	40	41	22	31	31	18	16
10 µg/g bio.	770	160	98	50	31	16	28	29	15	14
500 µg/g SDS	683	205	183	75	35	22	35	38	19	12
500 µg/g SDS	709	185	129	54	43	19	31	40	20	12
500 µg/g SDS	709	439	314	159	110	43	53	47	26	15
100 µg/g SDS	722	280	199	85	52	36	51	40	19	12
100 µg/g SDS	712	187	165	53	51	19	62	33	17	12
100 µg/g SDS	712	250	177	56	52	28	45	35	26	14
10 µg/g SDS	686	104	94	34	36	17	29	27	13	13
10 µg/g SDS	720	143	109	43	29	15	36	31	13	11
10 µg/g SDS	698	260	181	66	54	27	39	40	17	13
témoin (sans)	789	766	887		742	612	744	739	875	590
témoin (bio)	653	754	897	972	728	622	796	724	769	588
témoin (SDS)	716	844	880	943	781	676	784	770	754	601

Tableau C.12: Concentrations résiduelles de l'antracène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)									
	semaine 0	semaine 2	semaine 4	semaine 6	semaine 7	semaine 11	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	171	128	94	54	40	29	61	40	20	14
sans surfactant	162	77	88	58	56	17	30	30	17	12
sans surfactant	165	121	125		59	29	41	41	87	13
500 µg/g bio.	188	125	108	71	41	32	34	43	18	16
500 µg/g bio.	164	87	102	46	60	18	34	38	18	14
500 µg/g bio.	159	90	89	63	49	24	38	50	27	21
100 µg/g bio.	161	110	93	67	38	28	36	42	21	19
100 µg/g bio.	153		119	66	61	29	40	42	21	18
100 µg/g bio.	172	88	102	53	36	35	33	47	59	14
10 µg/g bio.	162	92	103	54	52	34	39		38	14
10 µg/g bio.	195	88	95	47	42	25	37	39	20	19
10 µg/g bio.	174	116	97	62	44	27	42	39	17	18
500 µg/g SDS	156	115	125	78	42	27	41	44	23	17
500 µg/g SDS	168	105	108	68	46	27	41	62	27	21
500 µg/g SDS	154	137	137	94	66	32	48	48	26	20
100 µg/g SDS	176	120	118	76	46	46	77	43	23	16
100 µg/g SDS	162	96	128	51	51	25		40	22	13
100 µg/g SDS	165	113	124	57	45	31	42	41	24	16
10 µg/g SDS	153	107	100	42	52	24	36	39	13	15
10 µg/g SDS	180	96	88	80	36	20	37	44	13	16
10 µg/g SDS	162	117	120	82	65	24	40	45	18	16
témoin (sans)	178	155	209		173	109	156	145	175	101
témoin (bio)	148	145	203	193	138	115	151	145	153	100
témoin (SDS)	194	164	192	184	155	138	151	151	165	122

Tableau C.13: Concentrations résiduelles du fluoranthène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)									
	semaine 0	semaine 2	semaine 4	semaine 6	semaine 7	semaine 11	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	826	969	1006	807	445	260	264	214	107	41
sans surfactant	832	934	924	740	404	202	226	157	79	38
sans surfactant	820	971	931	883	679	412	424	327	192	66
500 µg/g bio.	882	906	908	916	635	488	565	515	406	207
500 µg/g bio.	836	920	863	727	495	263	308	258	221	99
500 µg/g bio.	756	957	932	865	615	473	568	483	411	263
100 µg/g bio.	813	913	846	814	547	358	381	283	189	85
100 µg/g bio.	792	870	952	925	704	499	563	449	340	140
100 µg/g bio.	782	889	872	790	438	351	376	292	177	61
10 µg/g bio.	745	933		839	573	359	402	279	142	54
10 µg/g bio.	831	911	873	849	579	386	380	272	151	54
10 µg/g bio.	836	895	869	760	467	285	295	213	97	52
500 µg/g SDS	752	905	991	1025	700	584	699	560	548	370
500 µg/g SDS	788	941	956	1043	739	588	724	566	633	448
500 µg/g SDS	778	938	956	1024	797	583	707	595	639	489
100 µg/g SDS	794	897	955	998	730	575	658	534	487	224
100 µg/g SDS	777	864	965	950	681	479	539	429	360	128
100 µg/g SDS	779	948	921	944	720	506	624	479	476	179
10 µg/g SDS	757	840	820	650	417	239	275	178	82	34
10 µg/g SDS	790	881	841	741	471	279	342	230	109	43
10 µg/g SDS	782	931	903	1001	721	509	585	460	275	54
témoin (sans)	850	872	971		793	688	824	806	997	757
témoin (bio)	733	858	976	1088	791	696	902	782	827	750
témoin (SDS)	782	934	945	1056	823	759	885	811	860	774

Tableau C.14: Concentrations résiduelles du pyrène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)									
	semaine 0	semaine 2	semaine 4	semaine 6	semaine 7	semaine 11	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	558	672	701	543	312	176	179	146	75	24
sans surfactant	562	650	665	590	363	185	202	141	66	26
sans surfactant	533	673	674	595	449	267	268	217	112	38
500 µg/g bio.	603	627	652	632	434	331	378	354	293	162
500 µg/g bio.	568	647	615	592	448	262	304	264	212	96
500 µg/g bio.	514	672	681	637	462	354	426	376	336	281
100 µg/g bio.	558	634	586	540	373	246	263	201	115	54
100 µg/g bio.	537	609	660	600	432	299	331	264	170	65
100 µg/g bio.	535	619	614	516	308	230	252	199	111	39
10 µg/g bio.	513	646	714	558	377	231	265	191	93	33
10 µg/g bio.	565	633	613	508	364	256	239	175	94	31
10 µg/g bio.	540	619	618	498	317	191	199	146	64	34
500 µg/g SDS	507	630	718	740	513	419	485	383	386	285
500 µg/g SDS	536	649	690	749	537	417	471	400	462	354
500 µg/g SDS	527	611	671	726	570	410	493	414	444	368
100 µg/g SDS	536	622	678	705	509	378	426	350	283	120
100 µg/g SDS	530	601	701	678	473	324	367	298	200	71
100 µg/g SDS	525	656	666	651	483	320	400	313	287	105
10 µg/g SDS	516	591	581	467	316	184	213	139	61	25
10 µg/g SDS	531	620	583	466	305	180	224	155	66	26
10 µg/g SDS	534	642	645	699	492	328	379	309	159	32
témoin (sans)	570	608	673		527	458	553	555	689	514
témoin (bio)	504	591	679	739	539	465	599	534	581	525
témoin (SDS)	532	653	659	713	557	510	588	560	602	527

Tableau C.15: Concentrations résiduelles du benzo(a)anthracène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)					
	semaine 0	semaine 6	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	181	156	67	61	30	15
sans surfactant	178	145	63	49	28	15
sans surfactant	169	167	95	82	43	19
500 µg/g bio.	194	172	120	69	80	54
500 µg/g bio.	189	144	77	67	48	30
500 µg/g bio.	168	167	119	107	82	71
100 µg/g bio.	186	160	89	73	41	27
100 µg/g bio.	181	187	116	100	60	31
100 µg/g bio.	181	161	88	75	42	23
10 µg/g bio.	179	165	92	74	33	16
10 µg/g bio.	190	160	93	73	38	18
10 µg/g bio.	188	154	78	62	27	34
500 µg/g SDS	179	186	133	116	92	90
500 µg/g SDS	180	188	130	119	103	105
500 µg/g SDS	183	180	133	120	106	120
100 µg/g SDS	179	181	128	104	74	44
100 µg/g SDS	186	180	116	96	62	30
100 µg/g SDS	183	174	122	102	87	39
10 µg/g SDS	183	135	76	53	25	14
10 µg/g SDS	187	154	87	67	32	18
10 µg/g SDS	180	185	123	105	53	18
témoin (sans)	186		140	146	152	149
témoin (bio)	178	185	159	138	127	170
témoin (SDS)	181	181	153	146	134	165

Tableau C.16: Concentrations résiduelles du chrysène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)									
	semaine 0	semaine 2	semaine 4	semaine 6	semaine 7	semaine 11	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	169	185	236	201	143	86	104	92	53	25
sans surfactant	170	179	215	200	138	75	100	79	50	26
sans surfactant	162	183	214	206	172	105	130	106	80	37
500 µg/g bio.	180	181	209	211	157	115	148	141	127	83
500 µg/g bio.	171	177	197	193	158	88	121	104	98	60
500 µg/g bio.	152	184	210	215	159	118	156	134	127	98
100 µg/g bio.	161	178	194	203	152	105	125	106	75	46
100 µg/g bio.	163	167	208	224	163	113	146	128	112	56
100 µg/g bio.	160	173	209	196	141	102	125	104	74	37
10 µg/g bio.	159	169	228	203	150	101	127	101	64	25
10 µg/g bio.	173	173	201	199	161	103	128	99	68	31
10 µg/g bio.	173	170	205	200	153	92	111	86	53	24
500 µg/g SDS	156	171	219	217	156	121	158	132	132	112
500 µg/g SDS	159	171	211	225	161	124	156	137	146	120
500 µg/g SDS	161	173	203	209	165	119	149	137	136	131
100 µg/g SDS	157	177	209	211	160	122	155	125	117	78
100 µg/g SDS	168	173	214	211	159	113	144	122	105	54
100 µg/g SDS	166	176	208	204	163	113	155	125	130	72
10 µg/g SDS	161	160	196	182	135	83	114	74	44	33
10 µg/g SDS	162	170	206	197	146	90	122	88	54	27
10 µg/g SDS	163	172	206	218	162	63	150	127	88	33
témoin (sans)	171	164	209		157	117	154	155	177	141
témoin (bio)	157	162	207	214	155	121	169	145	151	152
témoin (SDS)	165	173	206	209	165	134	168	150	160	152
moy. témoin	164	167	207	211	159	124	163	150	162	148

Tableau C.17: Concentrations résiduelles du benzo(b)fluoranthène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)					
	semaine 0	semaine 6	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	108	118	95	103	135	73
sans surfactant	119	130	99	97	146	82
sans surfactant	108	126	96	108	162	89
500 µg/g bio.		132	96	108	160	74
500 µg/g bio.	112	124	105	108	138	83
500 µg/g bio.	113	121	105	115	142	82
100 µg/g bio.	118	120	102	106	167	107
100 µg/g bio.	121	140	104	105	146	90
100 µg/g bio.	115	120	101	100	145	86
10 µg/g bio.	128	124	99	105	131	66
10 µg/g bio.	126	124	100	110	141	75
10 µg/g bio.	131	122	99	99	136	75
500 µg/g SDS	114	133	97	106	140	76
500 µg/g SDS	103	127	103	107	135	83
500 µg/g SDS	109	120	99	103	130	78
100 µg/g SDS	116	122	109	104	139	82
100 µg/g SDS		122	106	103	137	73
100 µg/g SDS	120	121	105	111	151	81
10 µg/g SDS	125	118	105	112	141	67
10 µg/g SDS	112	117	106	109	138	61
10 µg/g SDS	125	135	105	109	139	71
témoin (sans)	108		91	103	115	88
témoin (bio)	126	132	104	109	132	79
témoin (SDS)	109	119	106	107	132	

Tableau C.18: Concentrations résiduelles du benzo(k)fluoranthène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)					
	semaine 0	semaine 6	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant		118	80	102	96	26
sans surfactant	73	113	85	85	112	38
sans surfactant	77	109	84	96	120	37
500 µg/g bio.		111	83	97	129	54
500 µg/g bio.	87	113	86	96	110	55
500 µg/g bio.	75	122	89	100	130	64
100 µg/g bio.	82	117	88	96	99	35
100 µg/g bio.	72	117	85	102	125	62
100 µg/g bio.	81	126	86	105	114	41
10 µg/g bio.	69	113	88	99	98	33
10 µg/g bio.	86	108	87	91	89	39
10 µg/g bio.	72	118	85	99	97	36
500 µg/g SDS		117	89	102	102	56
500 µg/g SDS	69	127	88	101	122	43
500 µg/g SDS	71	120	83	100	118	60
100 µg/g SDS	78	120	86	92	112	60
100 µg/g SDS	73	127	82	103	120	59
100 µg/g SDS	79	117	89	87	138	54
10 µg/g SDS	67	114	90	86	88	29
10 µg/g SDS	78	115	88	91	101	24
10 µg/g SDS	69	118	79	101	120	47
témoin (sans)	81		80	103	107	44
témoin (bio)	68	110	90	91	104	54
témoin (SDS)	76	119	81	93	118	53

Tableau C.19: Concentrations résiduelles du benzo(a)pyrène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)									
	semaine 0	semaine 2	semaine 4	semaine 6	semaine 7	semaine 11	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	101	72	129	99	82	50	71	71	93	45
sans surfactant	98	74	129	106	82	57	74	68	103	54
sans surfactant	89	75	126	104	86	62	72	74	110	62
500 µg/g bio.		74	120	106	78	59	71	74	100	58
500 µg/g bio.	97	75	121	99	81	59	77	73	97	69
500 µg/g bio.	93	79	123	100	80	59	77	71	99	63
100 µg/g bio.	99	69	118	106	86	60	76	74	99	62
100 µg/g bio.	96	73	125	116	79	65	79	73	96	69
100 µg/g bio.	93	76	124	104	80	67	76	75	97	56
10 µg/g bio.	100	74	137	105	76	63	75	78	89	44
10 µg/g bio.	105	76	117	100	84	63	78	74	90	54
10 µg/g bio.	95	71	121	104	81	63	76	73	93	54
500 µg/g SDS	95	74	130	105	76	65	76	75	89	60
500 µg/g SDS	90	79	128	107	80	60	77	76	95	56
500 µg/g SDS	91	81	127	105	78	61	74	72	88	62
100 µg/g SDS	95	74	131	104	78	65	76	72	92	64
100 µg/g SDS	92	79	136	103	82	64	76	73	94	62
100 µg/g SDS	91	76	128	98	82	65	85	73	107	64
10 µg/g SDS	93	78	115	99	77	66	79	75	91	53
10 µg/g SDS	96	80	128	102	81	63	78	73	92	45
10 µg/g SDS	95	77	121	106	81	61	77	73	94	56
témoin (sans)	97	77	126		74	55	68	71	81	56
témoin (bio)	95	71	128	106	77	58	79	70	88	62
témoin (SDS)	91	78	128	100	75	66	76	70	86	57

Tableau C.20: Concentrations résiduelles de l'indéno(1,2,3-cd)pyrène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)					
	semaine 0	semaine 6	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	136	39	35	34	36	42
sans surfactant	130	44	39	32	39	35
sans surfactant	116	44	42	34	39	38
500 µg/g bio.		45	43	36	38	42
500 µg/g bio.	112	43	45	35	36	42
500 µg/g bio.	108	54	45	34	34	39
100 µg/g bio.	110	61	45	46	32	42
100 µg/g bio.	119	51	42	38	37	41
100 µg/g bio.	103	53	44	36	38	38
10 µg/g bio.	113	55	43	34	37	36
10 µg/g bio.	114	50	40	36	36	38
10 µg/g bio.	116	53	42	34	34	41
500 µg/g SDS	101	55	44	37	34	39
500 µg/g SDS	103	57	40	37	34	41
500 µg/g SDS	103	54	44	37	34	38
100 µg/g SDS	102	53	46	35	36	38
100 µg/g SDS	109	55	46	36	35	40
100 µg/g SDS	106	48	46	35	44	41
10 µg/g SDS	104	52	45	38	37	39
10 µg/g SDS	105	51	52	36	37	42
10 µg/g SDS	107	56	47	41	37	43
témoin (sans)	109		33	33	30	35
témoin (bio)	111	52	43	37	34	40
témoin (SDS)	104	54	44	36	32	35

Tableau C.21: Concentrations résiduelles du dibenzo(a,h)anthracène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)					
	semaine 0	semaine 6	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	85	15	10	12	16	34
sans surfactant	85	15	11	11	20	16
sans surfactant	65	15	12	11	13	22
500 µg/g bio.		15	14	14	18	15
500 µg/g bio.	61	15	10	15	17	17
500 µg/g bio.	61	16	13	14	16	14
100 µg/g bio.	63	18	10	12	14	16
100 µg/g bio.	72	11	10	15	18	15
100 µg/g bio.	58	17	10	13	17	6
10 µg/g bio.	67	16	10	13	15	11
10 µg/g bio.	67	16	10	13	17	8
10 µg/g bio.	66	16	10	12	11	13
500 µg/g SDS	57	18	10	13	16	12
500 µg/g SDS	63	17	10	15	16	15
500 µg/g SDS	55	16	10	14	15	12
100 µg/g SDS	56	17	10	13	17	7
100 µg/g SDS	65	17	10	14	16	16
100 µg/g SDS	62	17	10	14	18	15
10 µg/g SDS	58	16	10	13	17	10
10 µg/g SDS	58	15	14	12	16	13
10 µg/g SDS	69	17	13	16	15	11
témoin (sans)	65		12	11	13	12
témoin (bio)	68	16	13	13	15	15
témoin (SDS)	54	16	12	11	12	10

Tableau C.22: Concentrations résiduelles du benzo(g,h,i)péрилène contenu dans le sol contaminé en présence et en absence de surfactants

Traitement	Concentration (mg/kg)					
	semaine 0	semaine 6	semaine 15	semaine 22	semaine 33	semaine 45
sans surfactant	65	32	30	24	30	26
sans surfactant	65	33	31	23	32	27
sans surfactant	65	30	27	22	34	33
500 µg/g bio.	78	40	31	25	27	5
500 µg/g bio.	66	30	34	25	30	26
500 µg/g bio.	68	37	32	23	28	26
100 µg/g bio.	62	40	33	24	29	26
100 µg/g bio.	67	38	33	27	26	29
100 µg/g bio.	55	40	32	24	28	26
10 µg/g bio.	64	36	32	26	30	21
10 µg/g bio.		36	34	24	27	32
10 µg/g bio.	61	38	30	25	28	31
500 µg/g SDS	65	38	33	25	25	38
500 µg/g SDS	52	43	32	27	29	31
500 µg/g SDS	59	36	33	25	25	28
100 µg/g SDS	59	40	34	22	26	26
100 µg/g SDS	59	40	34	28	30	26
100 µg/g SDS	61	38	36	23	34	29
10 µg/g SDS	66	37	32	27	29	28
10 µg/g SDS	53	38	35	27	27	25
10 µg/g SDS	58	42	32	29	27	22
témoin (sans)	65		32	26	23	22
témoin (bio)	62	39	35	28	25	25
témoin (SDS)	63	35	28	25	26	27