

00152

**INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
DES PÊCHES MARITIMES**



INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
DES PÊCHES MARITIMES

Laboratoire Micropolluants
Organiques

Trois ans après l'"Amoco-Cadiz" :
Hydrocarbures persistants dans les huîtres
et cinétique d'épuration

Contrat CNEXO n° 80/6317

par

J. P. GOUYGOU et P. MICHEL

Nantes, le 16 novembre 1981

I - INTRODUCTION

— L'accident de l'"Amoco-Cadiz" le 16 mars 1978 est venu compromettre gravement les activités ostréicoles implantées en Bretagne nord et plus spécialement dans l'Aber Benoît, l'Aber Wrac'h et la baie de Morlaix.

Malgré l'importance de la contamination, il est vite apparu que sur les huîtres les mortalités dues au pétrole étaient insignifiantes et les conséquences sur la physiologie des animaux restaient mineures.

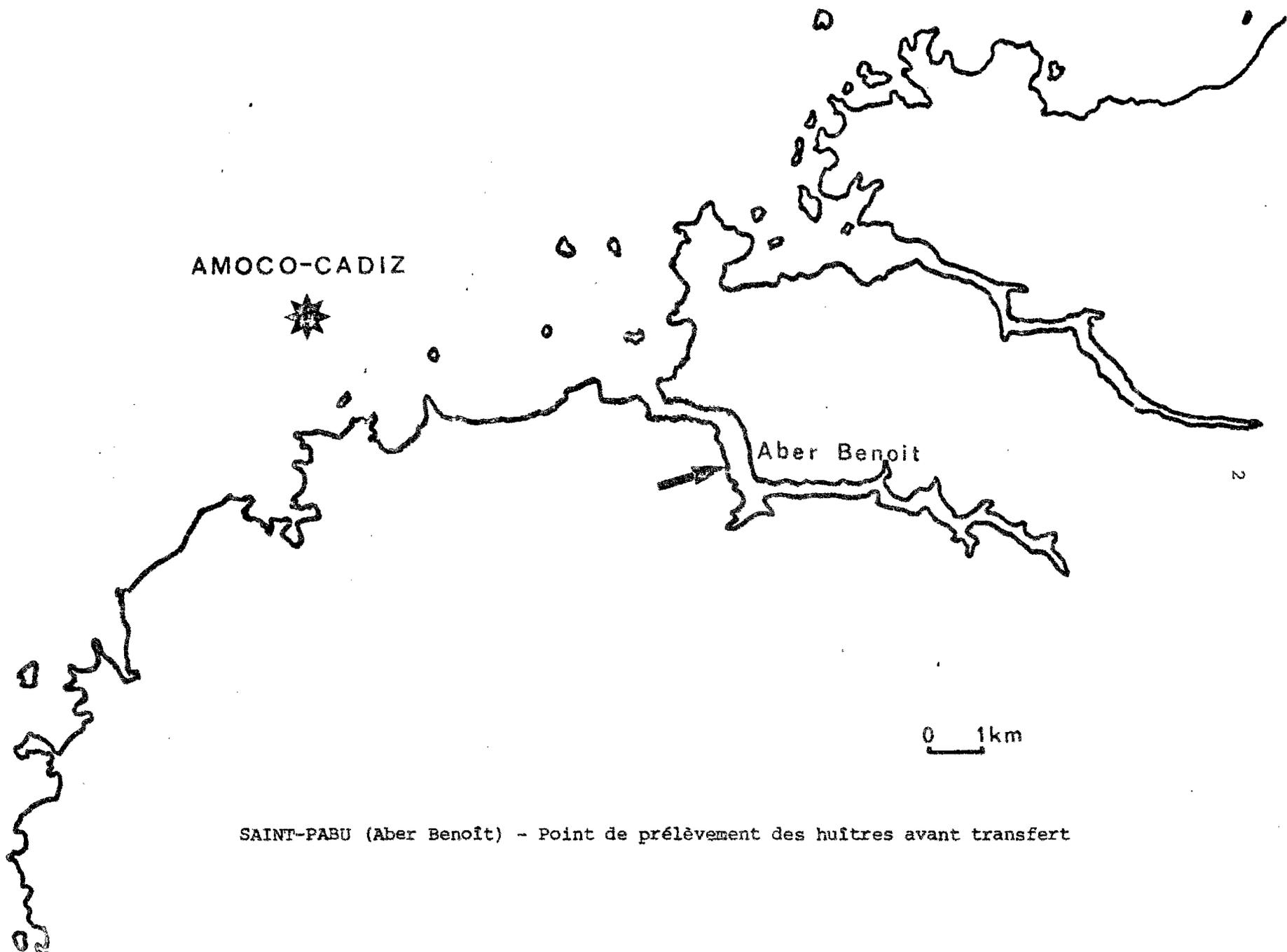
Par contre, du fait de l'aptitude de ces coquillages à concentrer les hydrocarbures présents dans l'eau et les matières solides en suspension, on a très vite atteint des concentrations en pétrole interdisant la commercialisation de ces produits avec toutes les conséquences économiques qui en résultent.

En baie de Morlaix, soumise à l'action directe de la mer, la situation s'est rapidement améliorée. Les abers qui pénètrent de plusieurs kilomètres à l'intérieur des terres se trouvent ainsi abrités des effets des vagues et les échanges avec la mer sont restreints. L'évolution y a été beaucoup plus lente.

Cette situation particulière des abers permettait avec trois ans de recul d'envisager deux types d'études susceptibles d'améliorer les connaissances et que les circonstances habituelles ne permettent pas d'effectuer.

La première étude concerne la biodégradation des hydrocarbures en milieu naturel. —

../..



SAINT-PABU (Aber Benoit) - Point de prélèvement des huîtres avant transfert

L'Aber Benoît au moment de l'accident a reçu d'un coup plusieurs milliers de tonnes de pétrole. Les échanges limités avec la mer et les phénomènes de piégeages dans les sédiments rendent ce site quasiment hermétique tant pour l'évacuation d'hydrocarbures que pour la pénétration de pollutions nouvelles. On peut donc à la limite assimiler ce site à un réacteur de biodégradation et contrôler avec trois ans de recul la nature des hydrocarbures les plus rémanents.

Pour ce faire il nous était possible de travailler soit sur les sédiments argileux qui restent très pollués, soit sur les huîtres qui accumulent des quantités importantes d'hydrocarbures. Nous avons pensé que les sédiments étaient plus hétérogènes du point de vue évolution du pétrole et que les huîtres permettaient d'avoir une meilleure idée des hydrocarbures mobilisables, c'est-à-dire ceux qui se trouvent soit en solution, soit adsorbés sur le sédiment très superficiel et sur les matériaux en suspension. Ce sont en fait ces hydrocarbures qui grâce à une meilleure oxygénation peuvent présenter la biodégradation la plus importante.

La seconde étude a trait à l'épuration d'huîtres soumises à contamination ancienne. En effet, il a déjà été démontré qu'après une pollution récente, les huîtres pouvaient s'épurer rapidement par réimmersion en zone propre, mais une incertitude subsistait quant à l'épuration de coquillages ayant séjourné longuement en présence d'hydrocarbures rémanents. Nous disposions ici de tous les éléments permettant de réaliser l'expérience et de lever l'incertitude.

Il faut ajouter que bien qu'étant distinctes, ces deux études ont des implications communes puisque le suivi de l'épuration des huîtres nécessitait la connaissance de la nature initiale précise du contaminant et que inversement la composition relative des hydrocarbures présents dans les huîtres ne pouvait être considérée comme représentative du milieu ambiant que dans la mesure où les huîtres n'accumulent aucun hydrocarbure de façon irréversible et donc qu'à tout moment il existe un état d'équilibre entre l'huître et l'écosystème environnant.

II - IDENTIFICATION DES HYDROCARBURES PERSISTANTS

Les hydrocarbures en milieu marin évoluent rapidement soit par évaporation des fractions les plus volatiles, soit par biodégradation, soit par photo-oxydation.

Trois ans après l'"Amoco-Cadiz" il était donc intéressant de noter la composition des hydrocarbures persistants. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler sur des huîtres (*Crassostrea gigas*) en état d'équilibre avec l'écosystème contaminé. En effet leur pouvoir d'accumulation est important ce qui simplifie les problèmes analytiques et elles donnent une bonne idée des hydrocarbures mobilisables qui nous intéressent.

L'analyse par couplage GC/MS (ANNEXE II) nous a permis de mettre en évidence l'évolution du pétrole issu de l'"Amoco-Cadiz".

L'identification d'un composé est effectuée par l'intermédiaire de son spectre de masse et de son temps de rétention. Ces deux données caractéristiques permettent d'identifier les différents hydrocarbures avec une bonne certitude.

Le tableau 1 représente les hydrocarbures mis en évidence ainsi que leurs proportions relatives.

L'examen de ce tableau nous permet de noter plusieurs éléments particulièrement intéressants.

En premier lieu les alkyls dibenzothiophènes (DBT) qui représentent plus de 56 % des hydrocarbures identifiés sont très largement majoritaires.

Il faut insister aussi sur la mise en évidence de composés lourds C_4 DBT, C_5 DBT, C_6 DBT et C_7 DBT alors que généralement les analyses des hydrocarbures de cette famille se limitent aux C_1 , C_2 et C_3 DBT.

../..

Valeur du rapport m/e	Nom de l'hydrocarbure identifié	Pourcentage relatif
198	C1 - Dibenzothiophène (DBT)	0,35
212	C2 - DBT	10,89
226	C3 - DBT	21,08
240	C4 - DBT	12,99
254	C5 - DBT	5,09
268	C6 - DBT	2,45
282	C7 - DBT	3,51
234	Naphtobenzothiophène (NBT)	0,71
248	C1 - NBT	4,22
262	C2 - NBT	6,58
276	C3 - NBT	1,76
178	Phénanthrène	0,18
192	C1 - Phénanthrènes	0,53
206	C2 - Phénanthrènes	4,56
220	C3 - Phénanthrènes	10,54
234	C4 - Phénanthrènes	5,09
202	Fluoranthène	1,05
202	Pyrène	0,34
216	C1 - Pyrènes	0,53
230	C2 - Pyrènes	2,45
244	C3 - Pyrènes	1,23
258	C4 - Pyrènes	0,35
228	Chrysène	1,92
242	C1 - Chrysènes	1,05
256	C2 - Chrysènes	0,53

Tableau 1 : Pourcentage relatif des hydrocarbures identifiés.

Nous pouvons noter aussi la présence en quantité très appréciable (13,27 %) d'une nouvelle série d'hydrocarbures thiophéniques les naphto-benzothiophènes et leurs dérivés alkylés en C1, C2 et C3.

Nous présentons en ANNEXE III les chromatogrammes reconstitués de ces deux familles d'hydrocarbures aromatiques soufrés ainsi que les spectres de masses caractéristiques des C3 DBT et C2 NBT.

Nous avons pu mettre en évidence la présence en proportion importante de la famille du phénanthrène 20,9 % et plus particulièrement des C2, C3 et C4 phénanthrènes.

Parmi les aromatiques lourds nous avons aussi pu identifier en proportion notable le fluoranthène le pyrène et leurs dérivés alkylés jusqu'en C4.

L'examen de ces résultats nous permet aussi de noter l'absence des hydrocarbures saturés présents initialement dans le pétrole de l'"Amoco-Cadiz" comme les n-alcanes, phytane et pristane ($m/e^- = 57$ et 71), les stéroïdes ($m/e^- = 217$) et les terpènes ($m/e^- = 191$).

Il nous faut remarquer enfin la disparition des alkyls benzènes ($m/e^- = 92, 106$) et des alkyls naphthalènes composés de rapport $m/e^- = 128, 142, 156$ et 170 .

Nous retrouverons également en ANNEXE III les chromatogrammes reconstitués du phénanthrène et de ses dérivés alkylés en C1, C2, C3 et C4, ainsi que ceux des hydrocarbures aromatiques lourds fluoranthène, pyrène, chrysène et leurs dérivés substitués jusqu'en C4.

Nous présentons aussi quelques spectres de masses d'hydrocarbures aromatiques.

Toutes les mesures effectuées pour la détermination des proportions relatives des différents hydrocarbures identifiés ont été réalisées sur les chromatogrammes des ions moléculaires en faisant l'hypothèse d'un facteur de réponse identique pour tous les composés ce qui a pour conséquence de sous-évaluer notablement les composés les plus lourds et particulièrement

leurs dérivés alkylés dont la fragmentation est encore plus importante.

Cette remarque accentue encore la prépondérance des hydrocarbures aromatiques lourds et fortement substitués.

Interprétation des résultats

L'identification des hydrocarbures persistants nous permet de souligner l'évolution particulièrement nette au cours du temps du pétrole de l'"Amoco-Cadiz".

Il contenait principalement au départ des hydrocarbures saturés parmi lesquels des n-alcanes de C10 à C 36, des hydrocarbures aromatiques comme les alkyls benzènes et les alkyls naphthalènes ainsi que le dibenzothiophène et ses dérivés alkylés en C1 et C2 composés que nous retrouvons chez la plupart des pétroles et produits pétroliers (Clark et Brown 1977) .

De nombreux auteurs (Anderson et Neff 1974 ; Neff et Coll. 1976) utilisent les alkyls naphthalènes comme indicateurs de pollution pétrolière des organismes marins. Calder et Coll. (1978) ont cependant insisté sur leur disparition rapide dans les sédiments contaminés. Nous confirmons ici leur absence au niveau des organismes marins, leur volatilité relative pouvant expliquer leur faible rémanence.

Pour les n-alcanes, Morel (1981) a montré que dans les sédiments la dégradation pouvait être considérée comme complète au bout d'un an.

L'absence simultanée dans les huîtres de l'Aber Benoît, d'hydrocarbures saturés et d'hydrocarbures aromatiques légers de la famille des alkyls benzènes ou alkyls naphthalènes permet d'affirmer qu'aucune pollution chronique ou accidentelle significative n'est venue interférer avec le pétrole issu de l'"Amoco-Cadiz". Cette constatation est importante puisqu'elle implique que les hydrocarbures identifiés ici ont bien trois ans de présence dans le milieu et de ce fait peuvent être considérés comme étant les plus rémanents.

La plus grande persistance des hydrocarbures aromatiques dans le milieu marin est un problème déjà connu (Blumer et Coll., 1970 ; Neff et Coll., 1976).

Ces hydrocarbures sont significatifs de l'état de pollution dans les organismes marins car Farrington et Meyer (1975) ont montré que leur origine biogénique était négligeable.

De nombreux auteurs ont déjà insisté sur la persistance des polyaromatiques soufrés.

Boehm et Coll. (1979) ont indiqué que ces composés étaient les plus résistants que ce soit à l'altération physico-chimique ou biochimique, confirmant ainsi les résultats de Grahl-Nielsen et Coll. (1978).

Berthou et Coll. (1981) ont montré la prédominance des C2 et C3 dibenzothiophènes dans les huîtres prélevées en 1979 dans l'Aber Wrac'h. Dans une étude similaire Laseter et Coll. (1979) ont mis en évidence que dans la famille du DBT les dérivés alkylés en C2 et C3 étaient plus résistants que les dérivés monoalkylés.

Dans les sédiments Atlas et Coll. (1981) publient une série de chromatogrammes correspondant à des échantillons prélevés en avril 1978 et juillet 1979.

Le dernier **chromatogramme** permet de mettre en évidence non seulement la présence majoritaire de C3 dibenzothiophènes mais aussi une enveloppe non résolue d'aromatiques beaucoup plus lourds.

L'examen des huîtres de l'Aber Benoît, trois ans après l'échouage de l'"Amoco-Cadiz" permet non seulement de confirmer les résultats déjà publiés, mais encore de les accentuer considérablement.

En effet, si nous avons trouvé des hydrocarbures polyaromatiques à 3 et 4 cycles avec leurs dérivés substitués méthyls, diméthyls et triméthyls comme cela est rapporté par ailleurs, nous avons pu aussi identifier des composés aromatiques beaucoup plus substitués tels que les C4, C5, C6 et C7 dibenzothiophènes. Ces composés sont probablement déjà présents dans le pétrole d'origine mais à taux relativement faible et se trouvent masqués à l'analyse par d'autres hydrocarbures prédominants.

De même la présence de naphthobenzothiophènes n'a pas été mentionnée jusqu'à présent à notre connaissance. Nous avons pu montrer qu'ils représentent cependant une fraction non négligeable des hydrocarbures rémanents.

Globalement, les hydrocarbures aromatiques soufrés représentent près de 70 % du total des hydrocarbures identifiés ce qui est tout à fait considérable. On peut penser que cela représente l'évolution normale d'un pétrole en milieu marin, mais il a fallu des circonstances très exceptionnelles pour en faire ici la démonstration. Nous avons eu en effet :

- . une pollution accidentelle massive,
- . l'absence de pollution pétrolière interférante,
- . un milieu relativement isolé qui n'a pas permis aux hydrocarbures persistants de se diluer dans la mer.

Ces trois conditions devaient être vérifiées simultanément pour que l'étude soit significative.

Mais à l'inverse, on peut penser que dans toute pollution pétrolière, les hydrocarbures aromatiques soufrés fortement alkylés sont masqués par quelques hydrocarbures d'origine plus récente.

La présence importante et la rémanence de ces hydrocarbures thiophéniques posent évidemment le problème de leur nocivité. Hermann et Coll. (1979) ont déjà étudié le pouvoir mutagène de certains dérivés. Mais compte tenu de la complexité du problème et des effets synergiques probables, il faut constater que les données toxicologiques sont actuellement très insuffisantes en ce domaine.

III - ETUDE DE LA DECONTAMINATION DES HUITRES APRES TRANSFERT EN ZONE PROPRE

Le problème de l'épuration des coquillages outre l'intérêt scientifique qu'il suscite, peut également avoir des incidences économiques non négligeables. De nombreux auteurs ont déjà réalisé des travaux à ce sujet : Stegeman et Teal (1973), Clark et Coll. (1977), Michel (1976), Neff et Coll. (1976), Bieri et Stamoulis (1977). Après l'"Amoco-Cadiz" Grizel et Michel (1979) ont montré qu'aussitôt après une pollution récente, les huîtres transférées en zone propre retrouvaient une teneur acceptable en hydrocarbures totaux après seulement 20 jours de réimmersion.

Toutefois, Friocourt et Coll. (1979) émettaient quelques réserves au sujet de l'épuration des hydrocarbures aromatiques plus rémanents et notamment des dibenzothiophènes.

Après avoir montré que les huîtres de l'Aber Benoît trois ans après l'accident de l'"Amoco-Cadiz" restaient contaminées à 70 % par des composés thiophéniques rémanents, il importait donc de vérifier avec ce type d'hydrocarbures la cinétique de décontamination.

Le point crucial dans ce type d'essais est de trouver un lieu de réimmersion en milieu naturel à l'abri de toute trace de contamination pouvant interférer. En milieu ouvert, cette garantie n'est offerte nulle part puisqu'il existe toujours un fond de pollution chronique. Nous avons donc choisi de réimmerger les huîtres dans une claire expérimentale de l'I.S.T.P.M. à Bouin en Vendée.

Les huîtres utilisées pour l'essai sont des *Crassostrea gigas* âgées de trois ans et qui ont séjourné à Saint-Pabu dans l'Aber Benoît pendant deux ans avant le lancement de cet essai. Leur contamination par les hydrocarbures aromatiques persistants ne peut donc être considérée comme superficielle.

L'essai de décontamination a été lancé le 20 février 1981 avec analyse spécifique des hydrocarbures aromatiques par HPLC avec détection en fluorescence (ANNEXE I) de l'échantillon avant réimmersion puis sur des prélèvements faits à intervalles réguliers.

De plus, des analyses détaillées par couplage GC/MS (ANNEXE II) ont permis de suivre l'évolution relative des divers hydrocarbures présents à divers stades de la décontamination.

Résultats

La mesure globale des hydrocarbures aromatiques au cours de l'essai a donné les résultats qui figurent au tableau 2 et sont représentés figure 1.

On peut noter que la teneur initiale en hydrocarbures aromatiques (49,5 mg/kg de poids sec) restait élevée à l'époque des essais. Ceci n'a rien d'étonnant puisque les sédiments de l'Aber Benoît restent contaminés et que surtout en période hivernale on assiste à une contamination notable du fait de la remise en suspension de sédiments.

L'examen de la figure 1 montre que la décontamination présente une phase initiale d'une quinzaine de jours pendant laquelle la cinétique est relativement lente. Ceci est probablement dû à la nécessité d'acclimatation des animaux après transfert. La décontamination est ensuite plus rapide et la vitesse devient approximativement proportionnelle à la concentration en hydrocarbures subsistants dans l'huître.

Le dernier prélèvement après 69 jours de réimmersion montre une contamination résiduelle de 28 % de l'état initial. L'expérience a dû être arrêtée à ce moment du fait de l'épuisement du stock d'huîtres ; mais il est possible par extrapolation de montrer qu'en quatre mois, l'épuration bien qu'encore incomplète sera satisfaisante.

../..

Durée de l'immersion en zone saine en jours	Teneurs en hydrocarbures aromatiques totaux en mg/kg de poids sec
0 jour	49,5
4 jours	48,0
11 jours	44,3
18 jours	41,2
25 jours	34,1
32 jours	24,4
53 jours	17,7
69 jours	14,2

Tableau 2 : Teneurs en hydrocarbures aromatiques totaux enregistrées après transfert des huîtres en zone non contaminée. Mesure en HPLC avec détecteur spectrofluorimétrique.

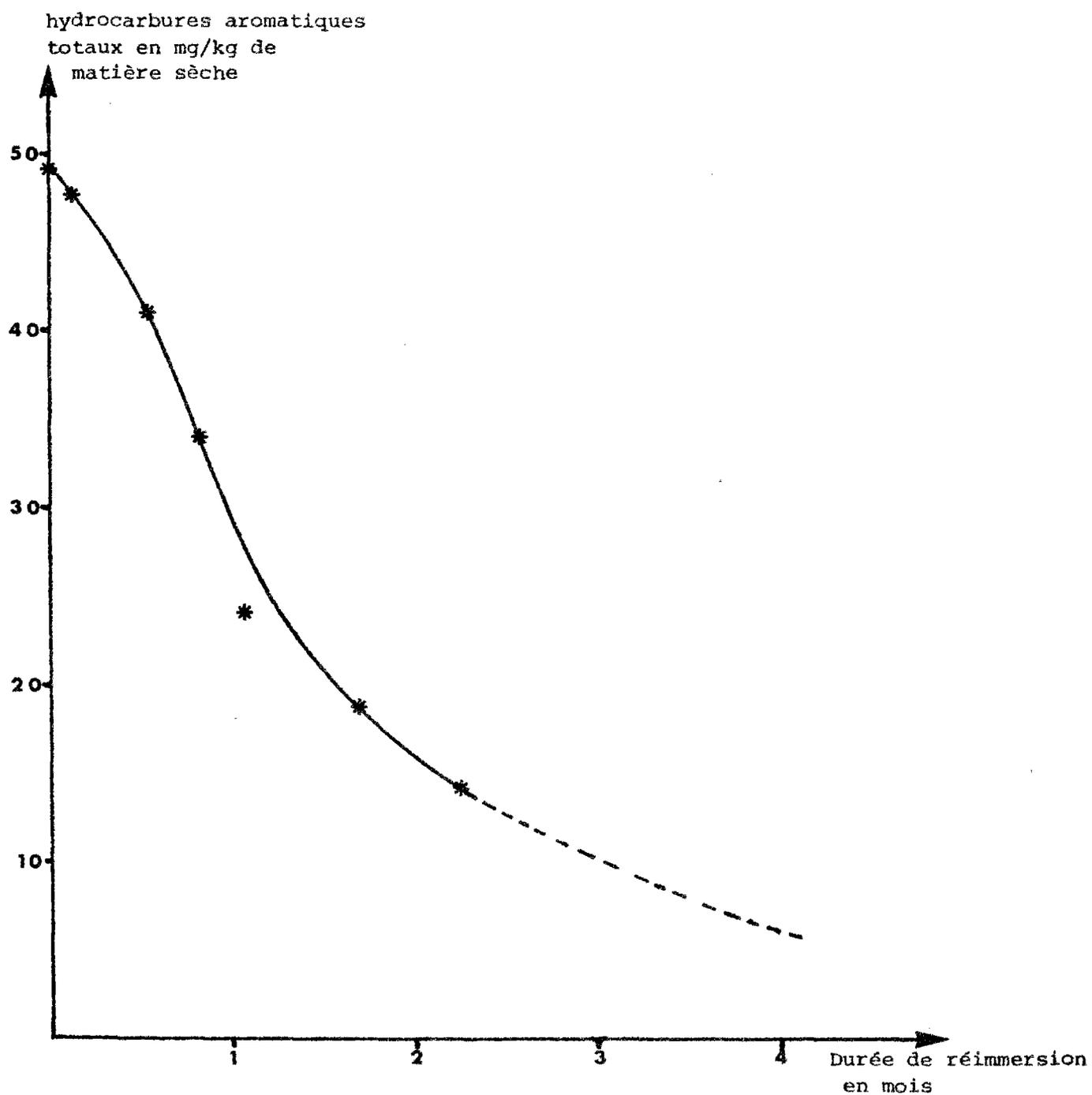


Figure 1 : Cinétique d'épuration des huîtres transférées dans les claires de la station expérimentale de l'I.S.T.P.M.

Cette extrapolation concernant la phase finale de décontamination ne peut se justifier que dans la mesure où l'épuration des hydrocarbures n'est pas sélective. Les analyses détaillées réalisées en couplage GC/MS sur plusieurs échantillons apportent une réponse à cette question (tableau 3).

Si l'on excepte des différences mineures liées pour l'essentiel à la précision analytique, il faut constater qu'on ne peut relever d'évolution significative dans la composition relative des divers hydrocarbures identifiés. Bien qu'en 69 jours 72 % des hydrocarbures aient été éliminés on ne note pas de différence caractéristique par rapport à la composition initiale.

Il convient cependant de limiter à cette expérience la conclusion d'une non sélectivité dans l'épuration des huîtres polluées par le pétrole. En effet, nous avons ici une mixture d'hydrocarbures tous rémanents qui de ce fait ont eu un comportement analogue. Dans le cas d'une pollution récente, la présence d'hydrocarbures plus volatils, plus hydrosolubles ou plus aisément métabolisables est un fait qu'on ne peut oublier. Cela explique alors les différences notées tant dans les cinétiques que dans les compositions relatives en hydrocarbures résiduels.

Conclusions

L'essai de décontamination d'huîtres *Crassostrea gigas* auquel nous avons procédé, peut être considéré comme présentant toutes les conditions les plus défavorables à une épuration du fait :

- . de la nature des hydrocarbures,
- . du séjour de deux ans des huîtres en zone polluée,
- . d'une température basse (3 à 5°) pendant l'essai, peu propice à une activité biologique intense.

.../...

Nous avons cependant montré que la décontamination des huîtres restait possible pour tous les hydrocarbures aromatiques y compris les plus rémanents. Dans aucun cas la contamination ne peut donc être considérée comme irréversible.

Le temps nécessaire à l'épuration est évalué à quatre mois dans les conditions où l'essai a été réalisé. On peut considérer qu'il s'agit là d'un maximum, toutes les circonstances les plus défavorables étant réunies, et qu'il n'y a pas contradiction avec les précédentes évaluations d'une décontamination rapide lorsque la contamination est récente.

../..

Hydrocarbure identifié	Pourcentage relatif avant transfert	Pourcentage relatif après 18 j d'immersion en zone saine	Pourcentage relatif après 69 j d'immersion en zone saine
C1 - DBT	0,35	0,77	0,87
C2 - DBT	10,89	8,42	8,69
C3 - DBT	21,08	16,85	18,49
C4 - DBT	12,99	9,66	10,84
C5 - DBT	5,09	6,71	7,35
C6 - DBT	2,45	5,07	3,82
C7 - DBT	<u>3,51</u>	<u>1,61</u>	<u>1,08</u>
<u>Total</u>	<u>56,36</u>	<u>49,09</u>	<u>51,14</u>
NBT	0,71	0,87	0,49
C1 - NBT	4,22	4,47	5,32
C2 - NBT	6,58	8,03	6,07
C3 - NBT	<u>1,76</u>	<u>1,65</u>	<u>3,32</u>
<u>Total</u>	<u>13,27</u>	<u>15,02</u>	<u>15,20</u>
Phénanthrène	0,18	0,17	0,17
C1 -Phénanthrènes	0,53	0,62	0,61
C2 -Phénanthrènes	4,56	2,68	2,75
C3 -Phénanthrènes	10,54	8,91	7,39
C4 -Phénanthrènes	<u>5,09</u>	<u>6,51</u>	<u>5,96</u>
<u>Total</u>	<u>20,90</u>	<u>18,89</u>	<u>16,88</u>
Fluoranthène	1,05	2,02	1,26
Pyrène	0,34	0,74	0,56
C1 -Pyrènes	0,53	1,74	1,67
C2 -Pyrènes	2,45	3,79	4,44
C3 -Pyrènes	1,23	2,94	3,92
C4-Pyrènes	<u>0,35</u>	<u>0,81</u>	<u>0,38</u>
<u>Total</u>	<u>4,90</u>	<u>10,02</u>	<u>10,97</u>
Chrysène	<u>1,92</u>	<u>2,46</u>	<u>2,12</u>
C1 -Chrysènes	1,05	2,03	1,54
C2 -Chrysènes	<u>0,53</u>	<u>0,41</u>	<u>0,86</u>
<u>Total</u>	<u>3,50</u>	<u>4,90</u>	<u>4,52</u>

Tableau 3 : Pourcentage relatif des hydrocarbures identifiés avant et après décontamination des huîtres transférées.

IV - CONCLUSIONS

Cette étude de la pollution dans l'Aber Benoît de par son caractère massif et de l'absence de pollution interférante, nous a permis de souligner l'évolution très nette à long terme des hydrocarbures dans le milieu naturel.

Dans les conditions habituelles de pollution chronique, il est très difficile sinon impossible de mettre en évidence cette évolution. En effet, la présence d'hydrocarbures plus faciles à analyser : n-alcanes, pristane, phytane, naphthalène, C1 et C2 naphthalènes, anthracène, phénanthrène, C1 et C2 phénanthrènes, dibenzothiophène, C1 et C2 dibenzothiophènes, masque complètement les autres composés. Ces hydrocarbures particulièrement bien résolus sur les chromatogrammes et recherchés le plus souvent dans les analyses de routine, ne sont pas les plus rémanents. Leur dégradation est relativement rapide et ils peuvent ne présenter qu'une infime minorité des hydrocarbures présents.

La situation particulière de l'Aber Benoît et l'absence de pollution chronique, nous ont donc permis de montrer que les hydrocarbures les plus persistants sont dans une proportion de 70 % des composés thiophéniques fortement alkylés puisqu'on a pu mettre en évidence toute la série des alkyls dibenzothiophènes jusqu'en C7, ainsi qu'une nouvelle série d'hydrocarbures thiophéniques à 4 cycles et ses alkyls substitués jusqu'en C3. Les autres hydrocarbures identifiés sont des composés alkylés à 3 et 4 cycles aromatiques.

Tous ces composés sont très certainement présents dans le pétrole initial mais à des teneurs relativement faibles et ils se trouvent de ce fait masqués à l'analyse.

../..

Dans les cas de pollution accidentelle à répétition ou dans les cas de pollution chronique, ces hydrocarbures rémanents ne peuvent pas être déterminés aussi nettement puisque les hydrocarbures plus récents faussent l'interprétation. Mais il est logique de penser que les constatations faites ici pour l'Aber Benoît sont susceptibles de généralisation et que dans tous les cas ces hydrocarbures rémanents sont présents.

Ceci pose le problème de la surveillance et de la nécessité d'une mesure globale et spécifique des hydrocarbures aromatiques (Michel, 1981) car les hydrocarbures identifiés ici représentent avec leurs isomères plus de 2000 composés qu'il est impossible d'analyser individuellement en surveillance de routine.

Enfin, nous avons montré que les huîtres contaminées par ces hydrocarbures rémanents pouvaient être épurées par réimmersion en zone propre. La décontamination est plus lente que celle obtenue avec des coquillages altérés par un polluant frais, mais on peut selon le degré initial de contamination retrouver des teneurs acceptables en 2 à 6 mois. Nous n'avons pu mettre en évidence au cours de cette étude, aucun hydrocarbure qui résisterait à cette épuration.

../..

V - BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON (J.N.) et NEFF (J.M.), 1974. - Accumulation and release of petroleum hydrocarbons by edible marine animals in "Recent advances in the assessment of the health effects of environmental pollution". - Intern. Sympos. CEE WHO. EPA, Paris, juin 1974, EUR 5360 : 1461 - 1469.
- ATLAS (R.M.), BOEHM (P.D.) et CALDER (J.O.), 1981. - Chemical and biological weathering of oil, from the "Amoco-Cadiz" spillage within the littoral zone. - Estuarine and Coastal Marine Science, 12 : 589 - 608.
- BERTHOU (F.), GOURMELUN (Y.), DREANO (Y.) et FRIOCOURT (M.P.), 1981. - Application of Gas chromatography on glass capillary columns to the analysis of hydrocarbon pollutants from the "Amoco-Cadiz" oil spill. - Journal of chromatography, 203 : 279 - 292.
- BIERI (R.H.), STAMOUDIS (V.), 1977. - The fate of petroleum hydrocarbons from a n° 2 fuel oil spill in a seminatural estuarine environment, in : "Fate and effects of petroleum and ecosystems" Wolfe D.A., Edit. Perg. Press, New-York, 1977, 332 - 344.
- BLUMER (M.), SOUZA (G.) et SASS (J.), 1970. - Hydrocarbon pollution of edible shellfish by an oil spill. Mar. Biol. 5, 195 - 202.
- BOEHM (P.D.), FIEST (D.L.) et ELSKUS (A.), 1979.- Comparative weathering patterns of hydrocarbons from the "Amoco-Cadiz" oil spill observed at a variety of coastal environments. Sympos. Intern. "Amoco-Cadiz" : Fates and effects of the oil spill. Brest. November.
- CALDER (J.A.), LAKE (J.) et LASETER (J.), 1978. - Chemical composition of selected environmental and petroleum samples from the "Amoco-Cadiz" oil spill. In "the Amoco-Cadiz oil spill, a preliminary scientific report", NOAA -EPA, 21 - 83.
- CLARK (R.C.) Jr, BROWN (D.W.), 1977. - Petroleum : properties and analysis in biotic and abiotic systems. In effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Marine Environments and Organisms. Vol. I (D.C. Malins, ed), Acad. Press., p. 73 - 75.
- FARINGTON (J.N.), MEYER (P.A.), 1975. - Hydrocarbons in the marine environment in "Environmental Chemistry" Eglinton G., 1975, 109 - 136.
- FRIOCOURT (M.P.), GOURMELUN (Y.), BERTHOU (F.), COSSON (R.) et MARCHAND (M.), 1979. - Effets de la pollution de l'"Amoco-Cadiz" sur l'ostréiculture en Bretagne Nord : Suivi chimique de la pollution, de l'épuration et de l'adaptation. Sympos. Intern. "Amoco-Cadiz" : Conséquences d'une pollution accidentelle par les hydrocarbures. Brest. Novembre.

- GRAHL-NIELSEN (O.), STRAVELAND (J.T.) et WILHELMSSEN (S.), 1978. - Aromatic hydrocarbons in benthic organisms from coastal areas polluted by Iranian crude oil. J. Fish. Res. Board Can., 35, p. 615 - 623.
- GRIZEL (H.), MICHEL (P.), ABARNOU (A.) et GUEGAN (B.), 1979. - Incidences de l'"Amoco-Cadiz" sur les exploitations ostréicoles. - Sympos. Intern. "Amoco-Cadiz" : Conséquences d'une pollution accidentelle par les hydrocarbures. Brest. Novembre.
- HERMANN (M.), DURAND (J.P.), CHARPENTIER (J.M.), CHAUDE (O.), HOFNUNG (M.), PETROFF (N.) VANDECASTEELE (J.P.) et WEIL (N.), 1979. - Correlations of mutagenic activity with polynuclear aromatic hydrocarbons content of various mineral oils. Fourth international Symposium on polynuclear aromatic hydrocarbons. October. Columbus Ohio.
- LASETER (J.L.), LAWLER (G.C.), OVERTON (E.B.), PATEL (J.R.), HOLMES (J.P.), SHIELDS (M.I.) et MABERRY (M.), 1979. - Characterization of aliphatic and aromatic hydrocarbons in flat and japanese type oysters and adjacent sediments collected from l'Aber Wrac'h following the "Amoco-Cadiz" oil spill. Intern. Sympos. "Amoco-Cadiz" : Fates and effects of the oil spill. Brest. November.
- MICHEL (P.), 1976. - Cinétique d'épuration in situ de moules contaminées par un gas oil. - Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches Marit., n° 259.
- MICHEL (P.), 1981. - Mesure globale des hydrocarbures aromatiques dans les produits marins par HPLC. - Cons. Int. Explor. Mer., Comité de la qualité de l'environnement marin, E : 54.
- MOREL (G.), 1981. - Evolution des hydrocarbures biogènes et fossiles dans un site confiné de la côte nord du Finistère, l'Aber Benoît, fortement perturbé par la pollution pétrolière de l'"Amoco-Cadiz". Thèse de 3ème cycle. Brest.
- NEFF (J.M.), COX (B.A.), DIXIT (D.), ANDERSON (J.N.), 1976. - Accumulation and release of petroleum, derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals. Mar. Biol., 38, p. 279 - 289.
- OUDOT (J.), VAN PRAET (M.), FERAL (J.P.), FUSEY (P.) et GAILL (F.), 1979. - Evolution de la contamination et de l'épuration des invertébrés marins après l'échouage de l'"Amoco-Cadiz". Sympos. Intern. "Amoco-Cadiz" ; conséquences d'une pollution accidentelle par les hydrocarbures. Brest. Novembre.
- STEGEMAN (JJ) TEAL (J.M.), 1973. - Accumulation, release and retention of petroleum hydrocarbons by the Oyster Crassostrea virginica. Mar. Biol., 22, 37 - 44.

ESTIMATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES PAR
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DANS LA MATIERE VIVANTE
ET LES SEDIMENTS

P. MICHEL

Institut scientifique et technique des Pêches maritimes

INTRODUCTION

Cette méthode est destinée à l'estimation de l'ensemble des hydrocarbures aromatiques susceptibles de donner une réponse en spectrofluorimétrie UV. De ce fait elle est significative pour l'évaluation des hydrocarbures fossiles puisque les teneurs en aromatiques biogènes sont extrêmement faibles et de plus parmi les hydrocarbures fossiles elle ne prend en compte que ceux qui sont les plus toxiques tant pour le consommateur que pour l'écosystème.

Nous avons associé la chromatographie liquide haute performance à la détection en spectrofluorescence des hydrocarbures pour trois raisons essentielles :

1 - Les échantillons de matière vivante peuvent être très riches en lipides divers qu'il est difficile de séparer parfaitement et de façon reproductible par chromatographie d'adsorption sur florisil. Or il est certain que la présence de lipides peut modifier l'intensité de fluorescence des hydrocarbures. Avec la HPLC on peut se contenter d'une purification préalable très sommaire.

2 - La présence d'oxygène dissous dans le solvant réduit considérablement le signal de fluorescence (effet de "Quencking"). Par exemple pour le benzopyrène, le dégazage du solvant par l'hélium en HPLC multiplie par 5 la réponse du détecteur. Ce facteur n'est pas maîtrisé en spectrofluorescence directe.

3 - Enfin, l'examen du profil chromatographique permet d'apprécier le nombre de cycles aromatiques puisque la durée d'éluion est croissante du benzène aux hydrocarbures à 5 cycles.

La méthode décrite ici permet de mesurer 0,5 mg/kg d'hydrocarbures aromatiques à partir d'un échantillon lyophilisé de 1 g.

DESCRIPTION DE LA METHODE

I. - Matériel

- Extracteurs type Soxhlet modifiés (voir schéma joint),
- ballons de 250 ml,
- évaporateur rotatif,
- chromatographe HPLC HP 1081 isocratique avec injecteur automatique et système "backflush",
- colonne HIBAR Merck Si 60 125 mm 5 microns,
- détecteur spectrofluorimétrique "SHOEFFEL",
- hélium,
- intégrateur HP 5880 permettant une intégration du type distillation simulée.

Toute la verrerie est lavée avec détergents rincée soigneusement à l'eau distillée et placée à 300°C en étuve ventilée pendant 8 h.

II. - Produits chimiques

Tous les solvants doivent être de très haute qualité notamment ils ne doivent pas contenir de résidus non volatils et ne donneront pas de signal en fluorescence. Nous utilisons :

n-pentane SDS qualité purex

n-hexane SDS qualité Spectrosol

Acétonitrile SDS qualité Spectrosol

Florisil Merck traité au four à 600° pendant 4 h puis désactivé par

2 % d'eau.

III. - Extraction

L'extraction est faite par le pentane dans le système Soxhlet modifié décrit en annexe pendant 5 h. Elle nécessite 100 ml de pentane et 5 g de Florisil. Dans le cas de la matière vivante 1 g d'échantillon lyophilisé suffit. Pour les sédiments peu contaminés on peut traiter 10 g d'échantillon. On règle le chauffage de façon à avoir une goutte par seconde au bas du réfrigérant. Les molécules les plus polaires restent adsorbées sur Florisil et ainsi on ne risque pas de détériorer la colonne HPLC.

On évapore ensuite sous vide à l'évaporateur rotatif et on reprend par 2,5 ml d'hexane. L'échantillon est alors prêt pour l'analyse.

IV. - Analyse HPLC

Les conditions utilisées sont les suivantes :

- colonne Si 60 5 microns 125 mm Hibar Merk,
- éluant n-hexane + 0,5 % d'acétonitrile, soigneusement dégazé à l'hélium,
- température 35°C,
- débit 2 ml/mn,
- pression 70 bars environ,
- quantité injectée 10 microlitres,
- durée d'élution des hydrocarbures aromatiques 2,5 minutes puis "Backflush" pendant 5 mn,
- durée totale d'analyse 8 minutes.

Spectrofluorimètre :

- excitation 270 nm,
- émission > 310 nm (la fenêtre du photomultiplicateur servant des filtres passes-bas).

La sensibilité du spectrofluorimètre est réglée de façon à assurer à la fois la sensibilité et l'amplitude dynamique suffisante. Ces réglages dépendent de l'état de la lampe d'excitation et du photomultiplicateur.

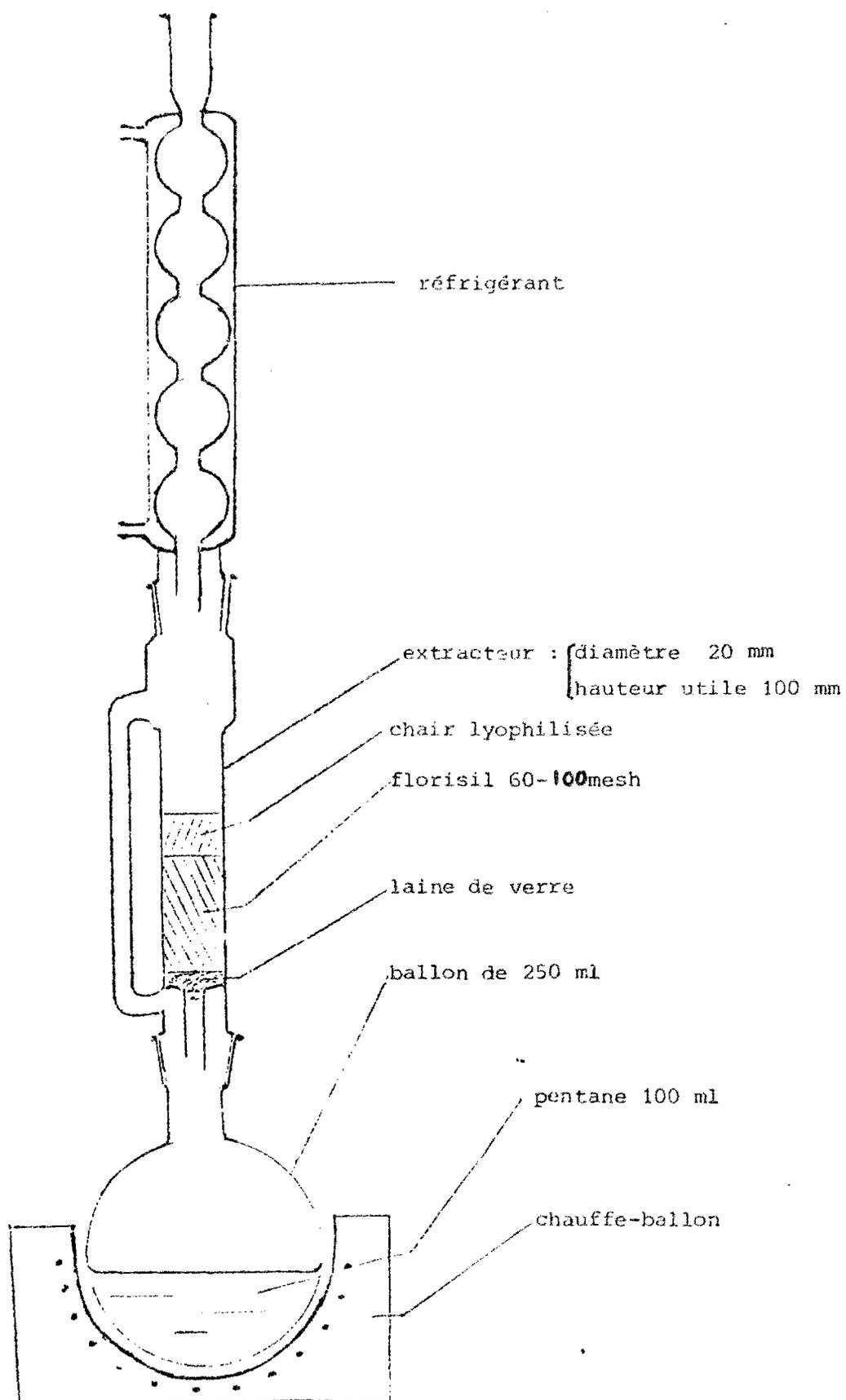
Lorsque la colonne est équilibrée et tous les réglages corrects, on a pour le chrysène un temps de rétention voisin de 2 minutes et une réponse linéaire du détecteur entre 0,5 et 200 μ g injectés.

V. - Quantification

L'estimation des hydrocarbures aromatiques est faite par intégration du signal fluorimétrique dû à l'échantillon et comparaison avec celui fourni par un étalon externe, le chrysène.

Les résultats sont exprimés en mg d'hydrocarbures aromatiques par kg d'échantillon sec.

SYSTÈME D'EXTRACTION-PURIFICATION
DES HYDROCARBURES



IDENTIFICATION DES HYDROCARBURES PERSISTANTS PAR COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE
GAZEUSE/SPECTROMETRIE DE MASSE

La préparation de l'échantillon est décrite en ANNEXE I.

Les conditions utilisées sont les suivantes :

- chromatographie en phase gazeuse
 - . colonne capillaire en verre WCOT (25 m x 0,25 mm)
garnie de SE 30
 - . gaz vecteur Hélium
 - . débit 2 ml/mn
 - . injection "spitless"
 - . température d'injection 270° C
 - . température de l'interface 330° C
 - . température du four programmée de 100 à 270° C (5°/mn)

- spectrométrie de masse
 - . spectromètre de masse RIBERMAG R 10 - 10 couplé
au système informatique SIDAR 121
 - . mode d'ionisation : impact électronique (70 e V)
 - . gamme de masse balayée : 50 - 350 en 1,5 s.

Compte tenu de la sélectivité du spectromètre de masse, l'échantillon est injecté directement dans la colonne sans séparation préalable entre hydrocarbures aromatiques et saturés.

L'identification de l'hydrocarbure est effectuée par l'intermédiaire de son spectre de masse et de son temps de rétention. Toutes les mesures effectuées pour la détermination des proportions relatives des différents hydrocarbures identifiés ont été réalisées par intégration sur le chromatogramme reconstitué des pics de l'ion moléculaire en faisant l'hypothèse d'un facteur de réponse identique pour tous les composés.

Ceci a pour conséquence de sous-évaluer notablement les composés les plus lourds et particulièrement leurs dérivés alkylés dont la fragmentation est plus importante.

ANNEXE III

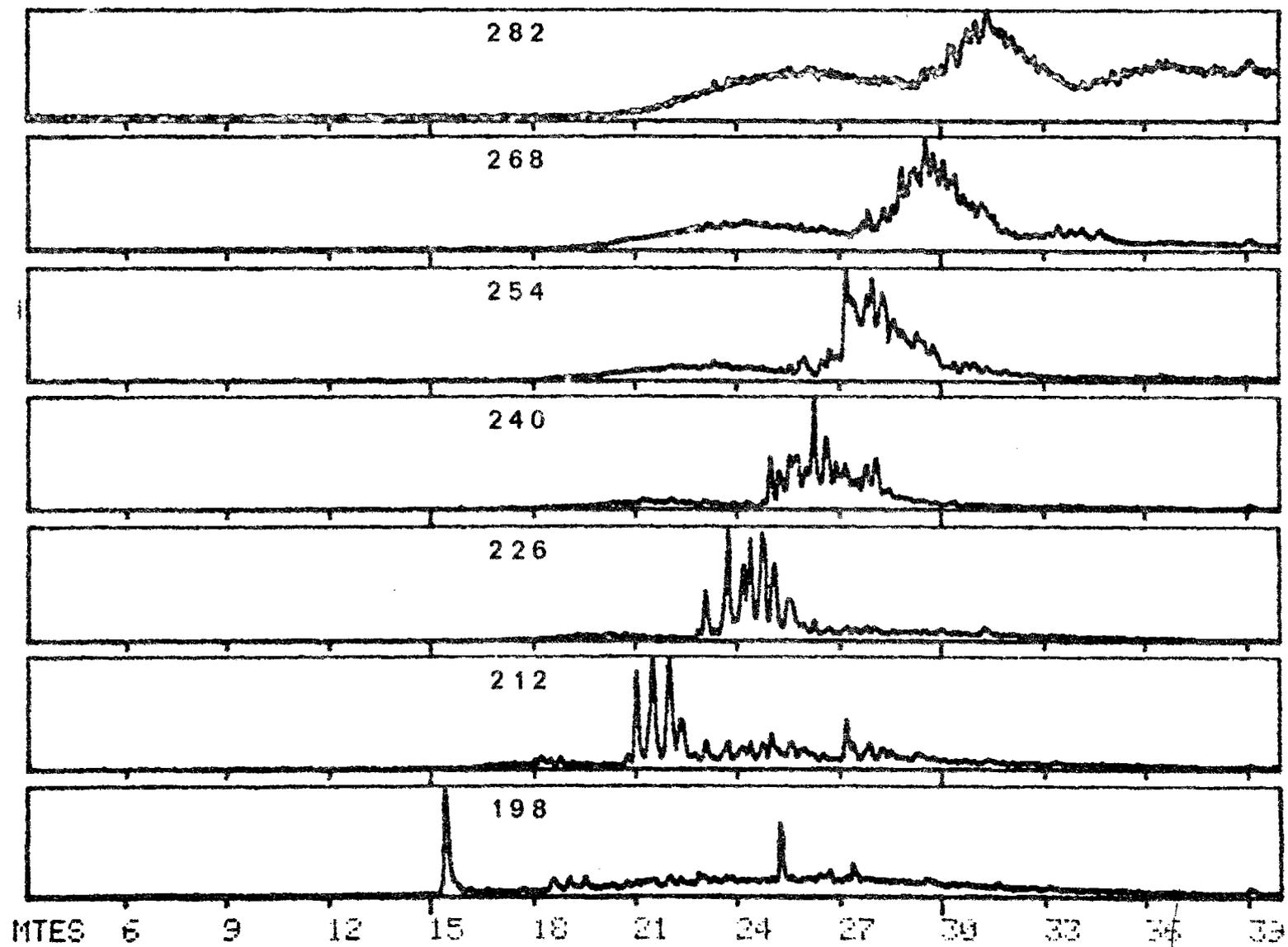
=====

- Chromatogrammes caractéristiques obtenus par H P L C.

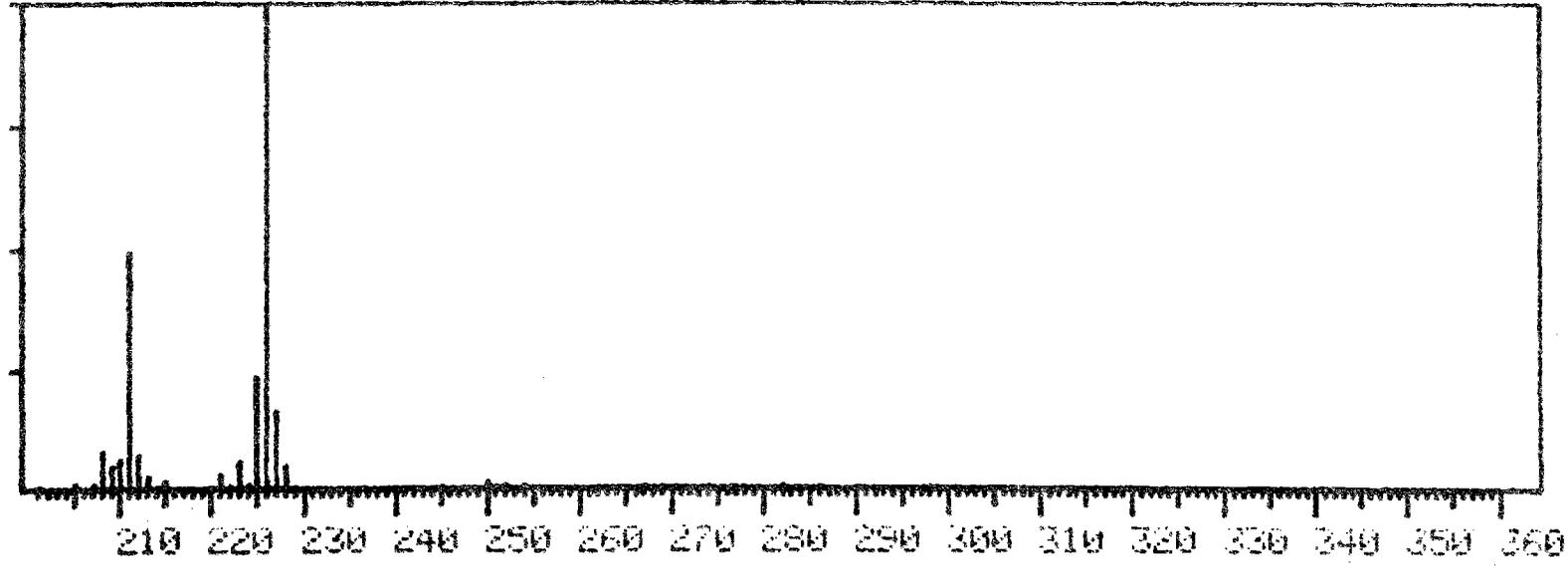
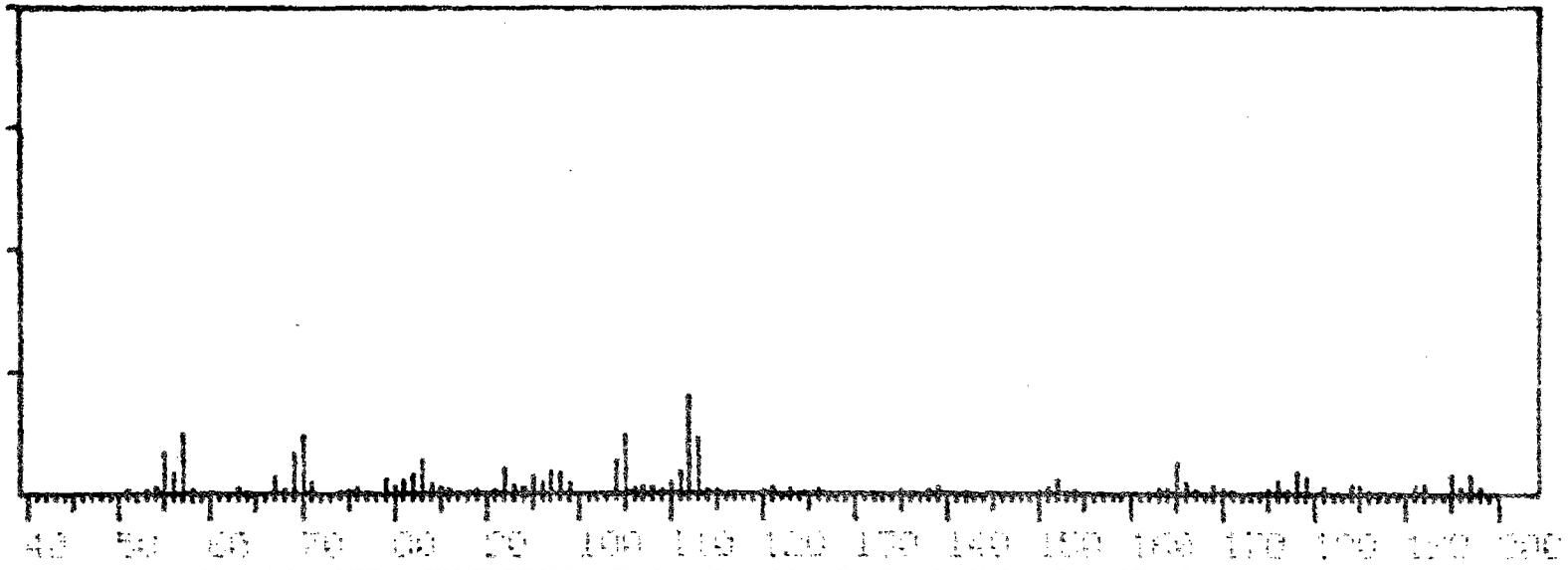
- Chromatogrammes reconstitués de différentes familles d'hydrocarbures identifiés par GC/MS.

- Spectres de masses caractéristiques de quelques hydrocarbures rémanents.

Ces chromatogrammes reconstitués sur des ions spécifiques sont représentatifs des alkyls dibenzothiophènes
($m/e^- = 198, 212, 226, 240, 254, 268, 282$)

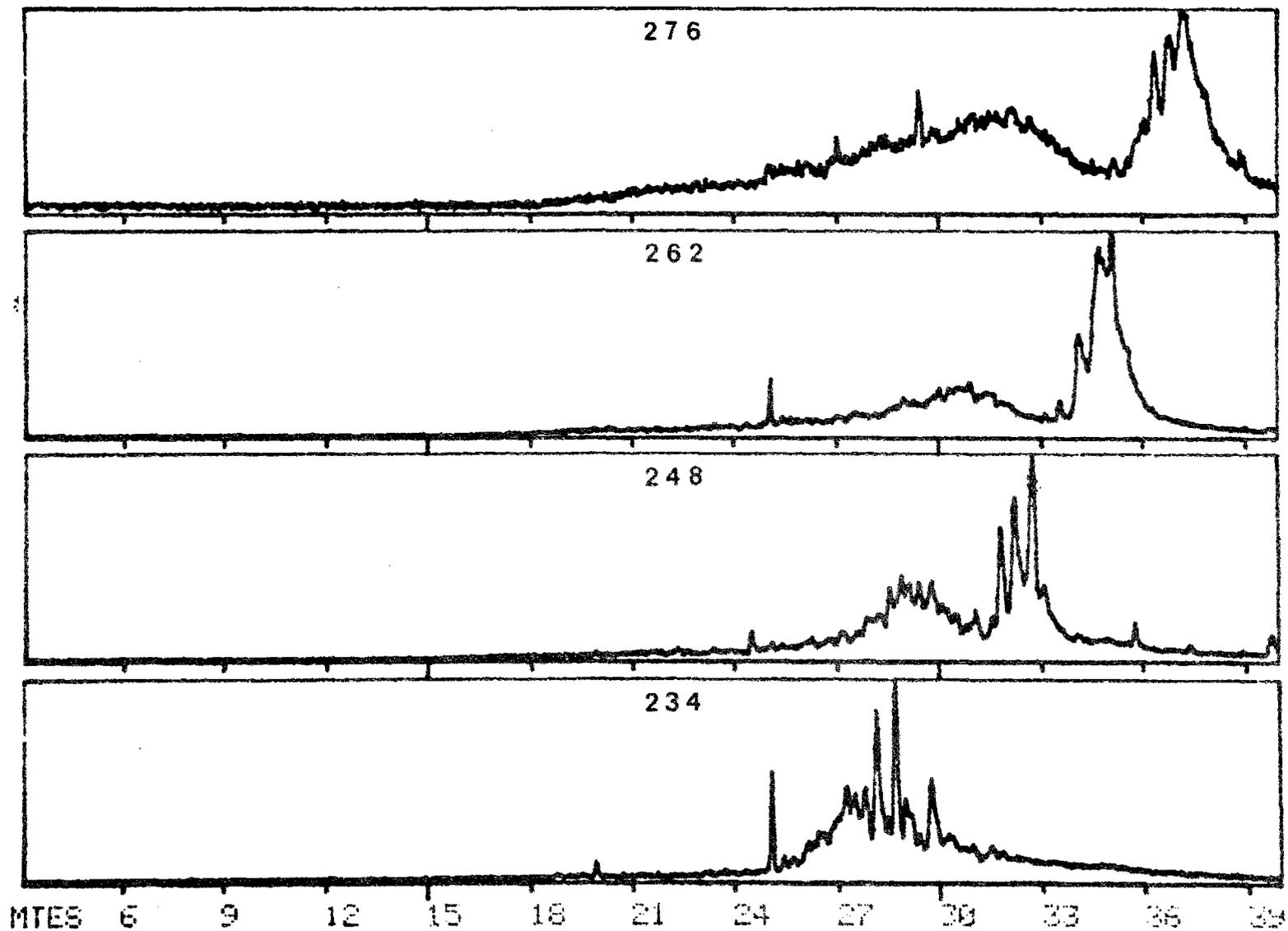


MS-23 42

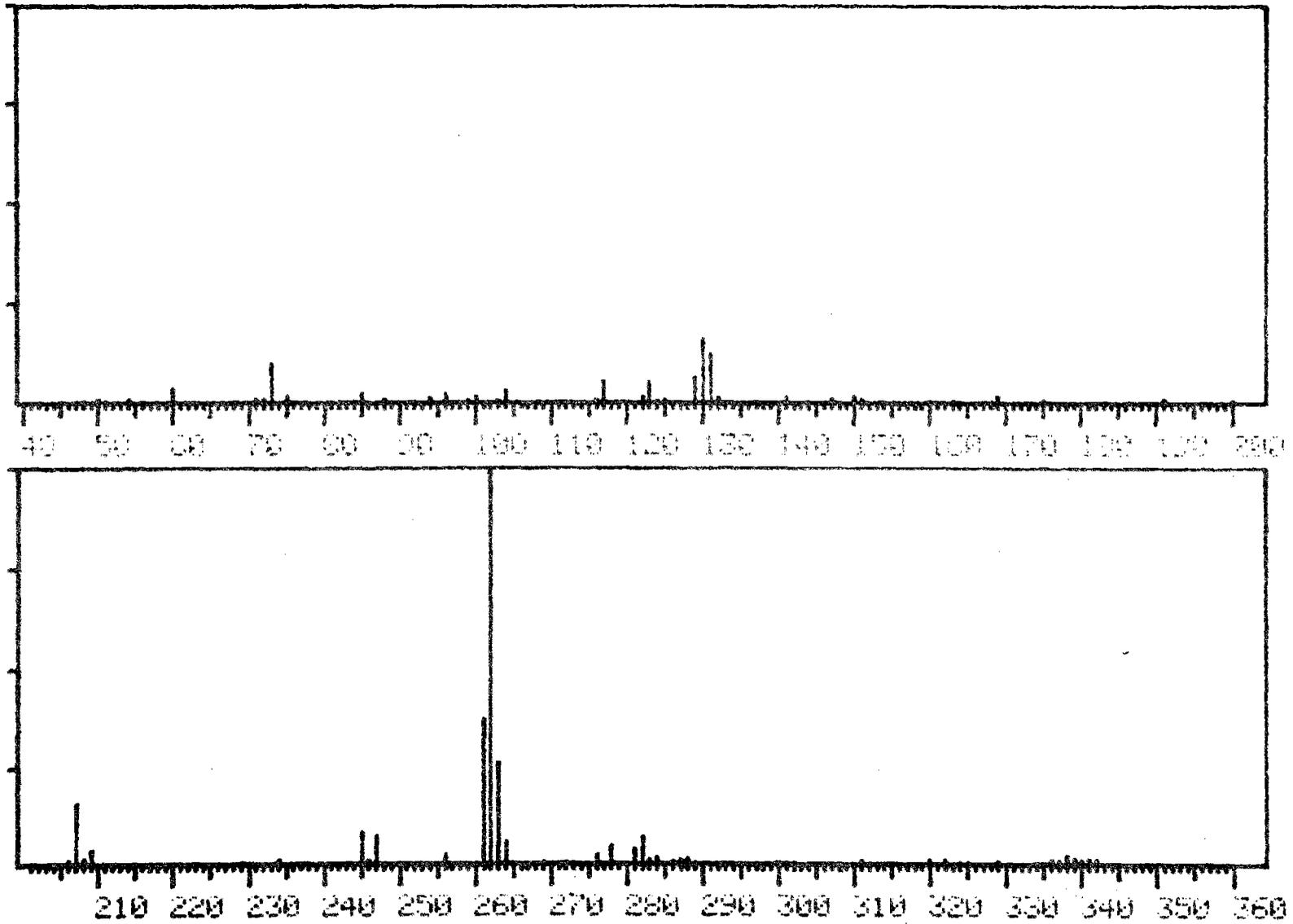


Spectre de masse d'un C3 dibenzothiophène

Ces chromatogrammes reconstitués sur des ions spécifiques sont représentatifs des naphthobenzothiophènes et alkyls substitués ($m/e^- = 234, 248, 262, 276$).

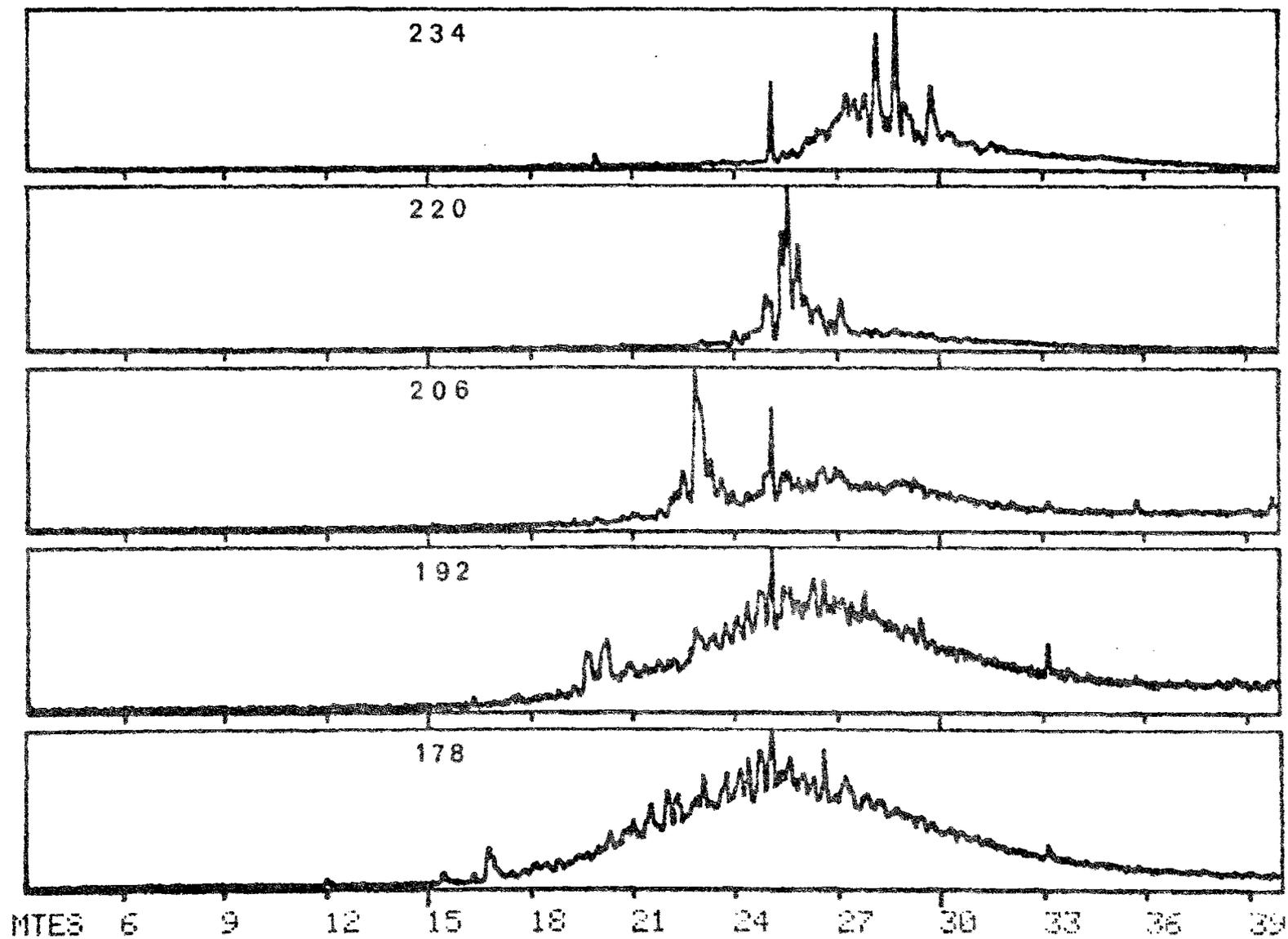


100-135 7

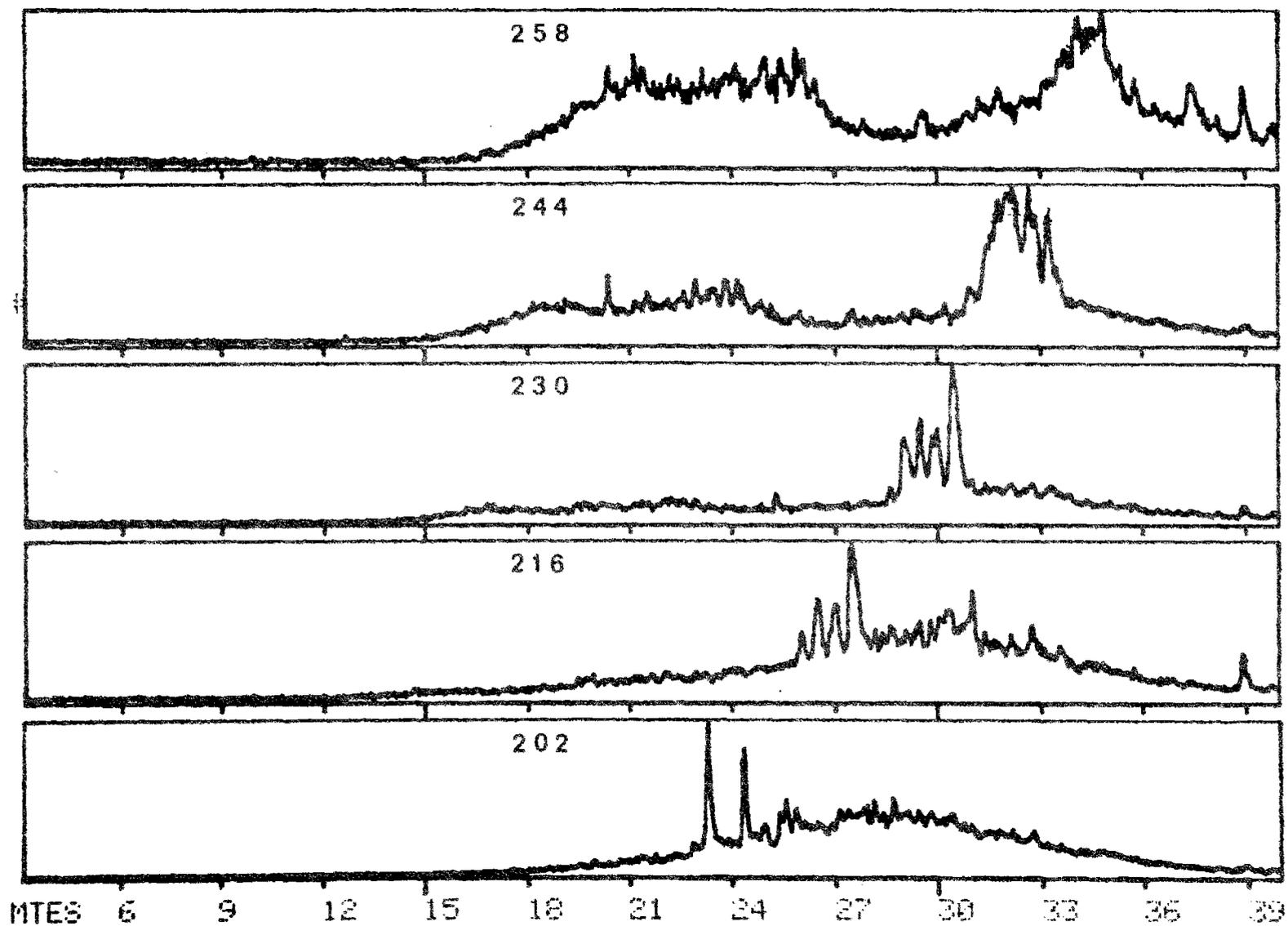


Spectre de masse d'un C 2 naphthobenzothiophène

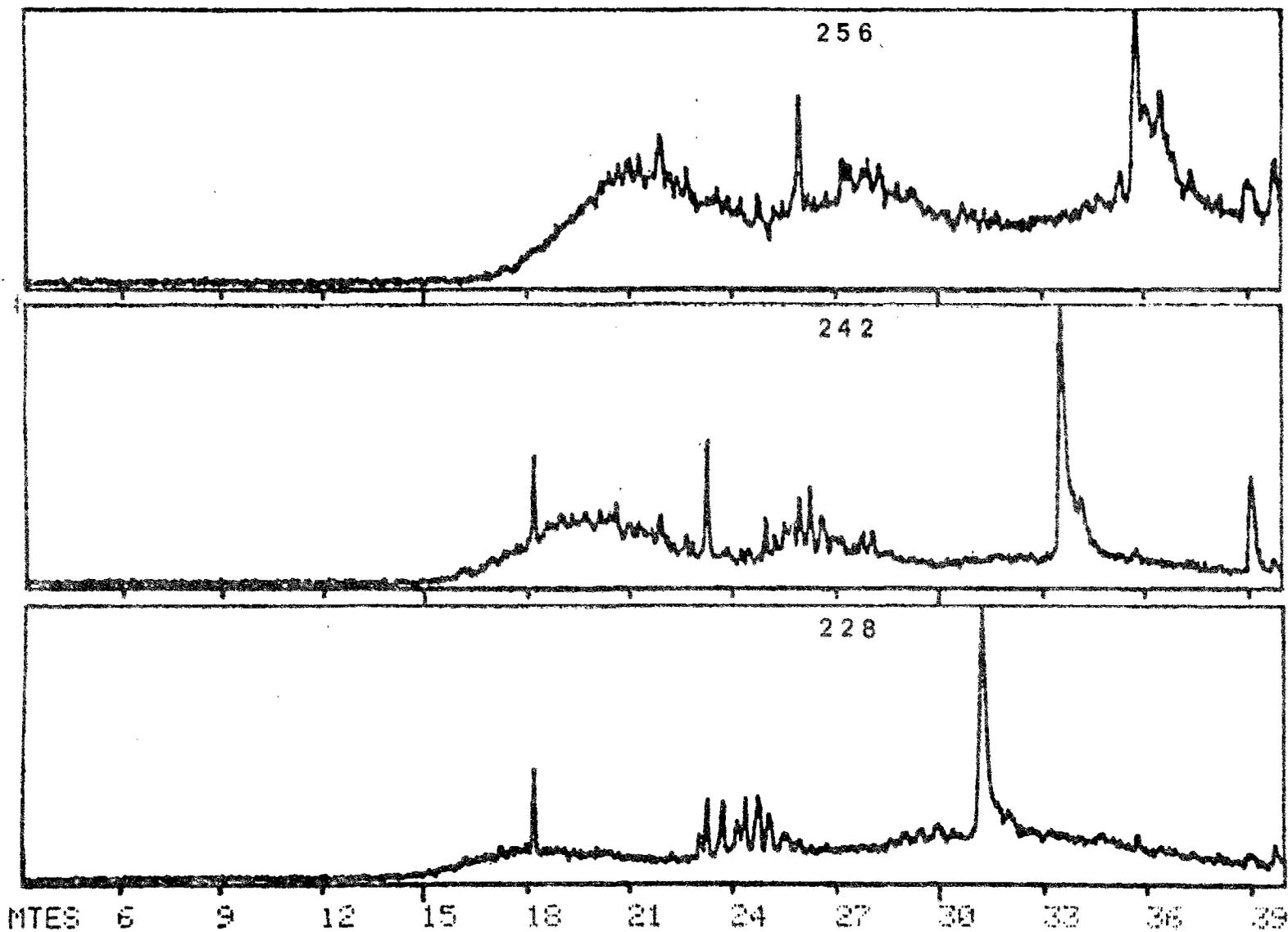
Ces chromatogrammes reconstitués sur des ions spécifiques sont représentatifs des phénanthrènes et alkyls phénanthrènes ($m/e^- = 178, 192, 206, 220, 234$).



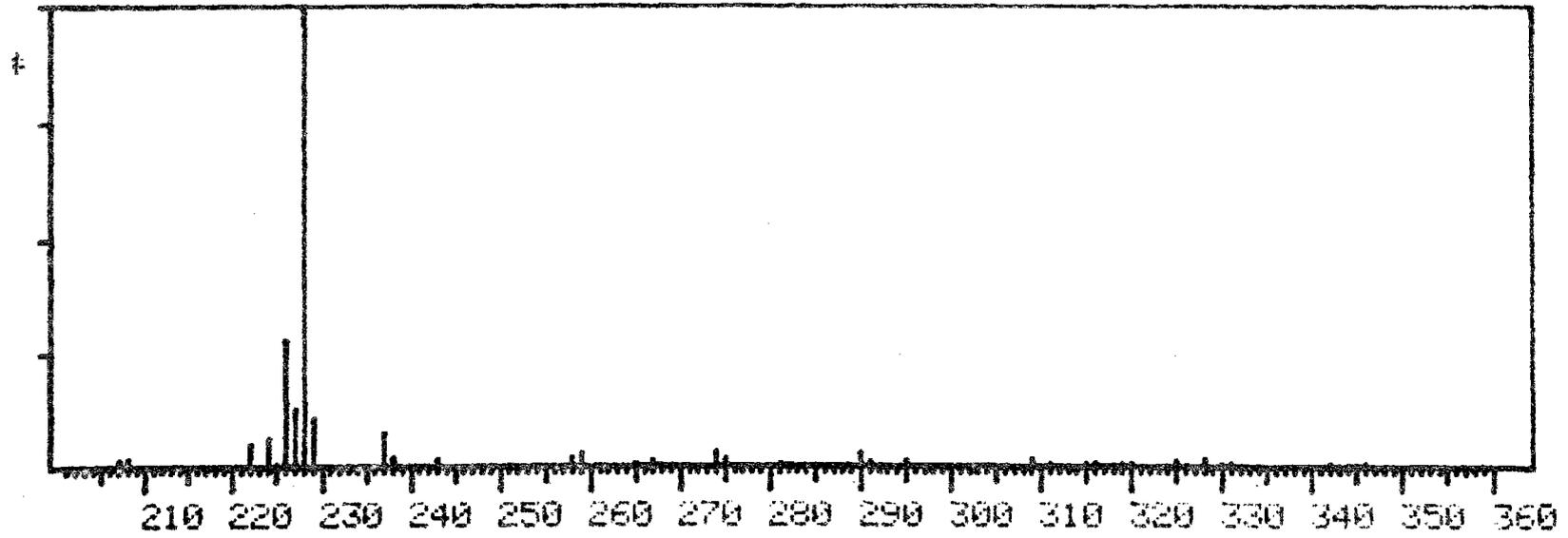
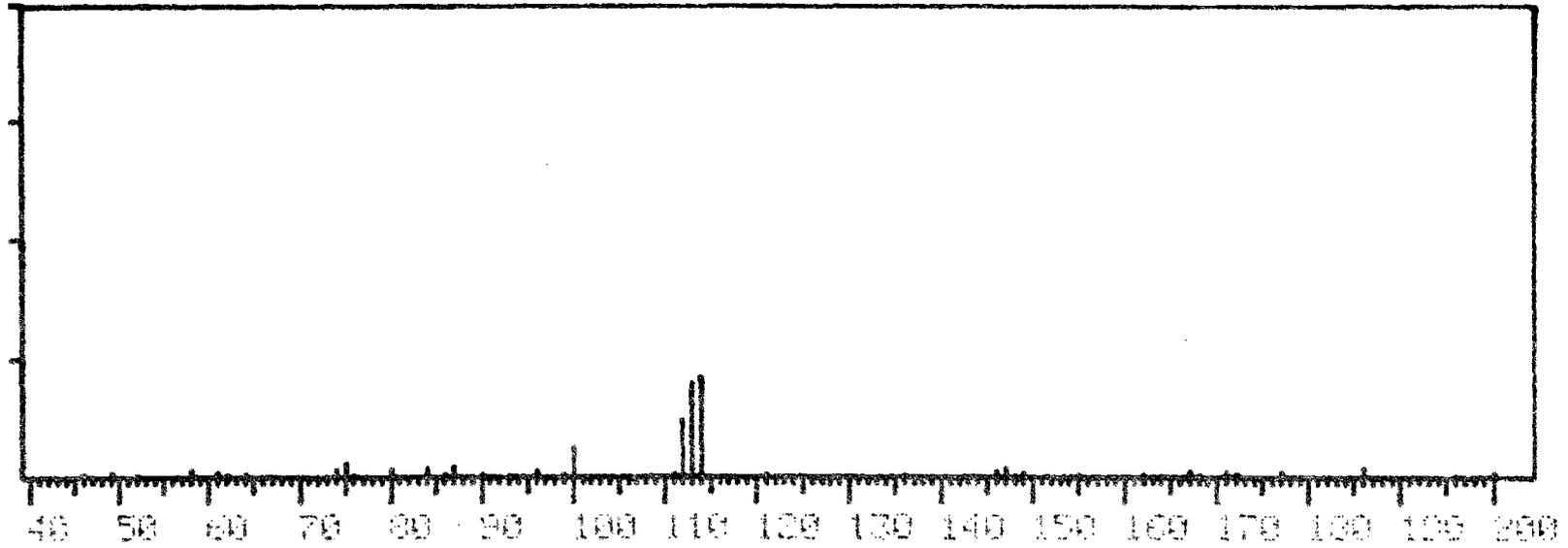
Ces chromatogrammes reconstitués sur des ions spécifiques sont représentatifs des fluoranthènes, pyrènes et alkyls substitués ($m/e^- = 202, 216, 230, 244, 258$).



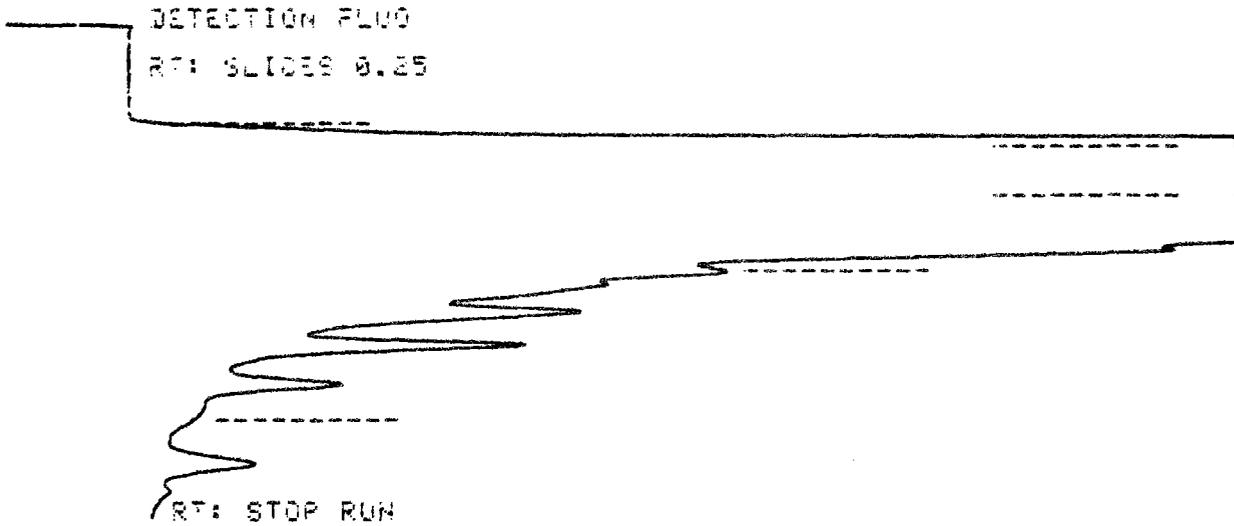
Ces chromatogrammes reconstitués sur des ions spécifiques sont représentatifs du chrysène et de ses alkyls substitués ($m/e^- = 228, 242, 256$).



RT=31.14



Spectre de masse du chrysène



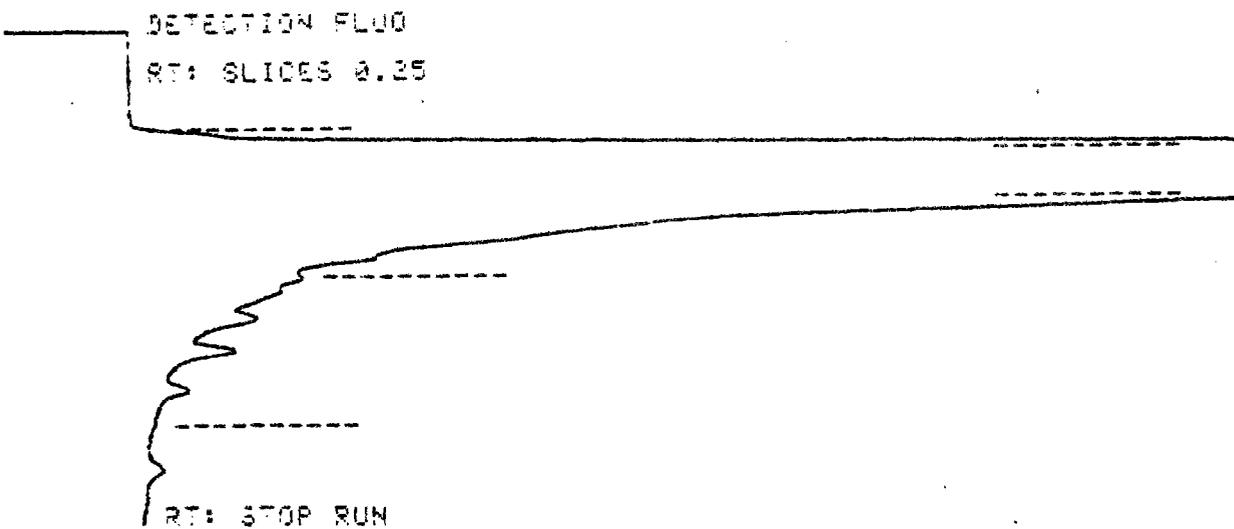
4

16:51 MAY 19, 1981

ECHANTILLON N°: 29.293 - 0

AROMATIQUES	1	2	3	4	5	TOTAL
FLUO	1.6	20.1	15.2	3.4	0.7	41.2 MG/KG

STOP=0;RELANCE=1 ? 0
END OF PROGRAM



7

16:26 MAY 19, 1981

ECHANTILLON N°: 29.296 - 0

AROMATIQUES	1	2	3	4	5	TOTAL
FLUO	1.0	7.5	4.3	1.2	0.2	14.2 MG/KG

Chromatogrammes obtenus par HPLC